

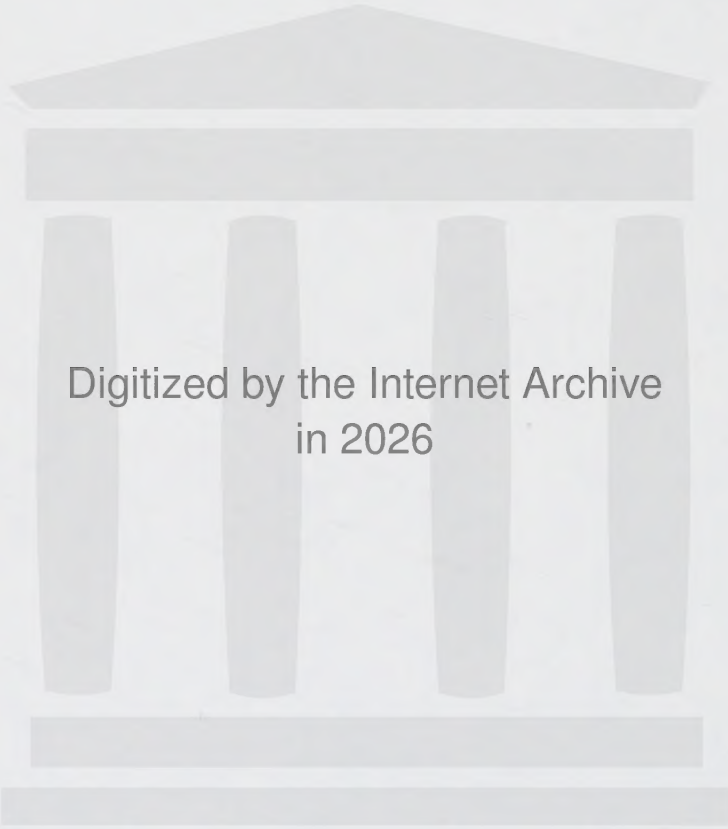
Untersuchungen zur Charakterisierung
von Oberflächenantigenen
der Schilddrüsenzelle
mittels humaner Antikörper

Brigitte Mayinger

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554619_0032

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Vorstand: Professor Dr. E.Buchborn

Untersuchungen zur Charakterisierung von
Oberflächenantigenen der Schilddrüsenzelle
mittels humaner Antikörper

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig – Maximilians – Universität zu München

vorgelegt von
BRIGITTE MAYINGER
aus München

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr. K.Horn

Mitberichterstatter: 1. Prof.Dr. E.Buchborn
2. Prof.Dr. E. – P.Rieber

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. Gärtner, Dr. Greil

Dekan: Prof.Dr. W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.1987

Mein Dank gilt:

Herrn Professor Dr. med. K. Horn,
Herrn Dr. Gärtner und Dr. Greil
für ihre stetige Unterstützung und Förderung,
sowie Frau Isemann und Frau Hörterer
für die angenehme Zusammenarbeit
und sachkundige Hilfe.

Über die Ergebnisse dieser Arbeit wurde auszugsweise be-
richtet auf dem 9. Internationalen Schilddrüsenkongreß
1985 in Sao-Paulo (19)
und
auf dem Internationalen Symposium "Thyroid and Autoim-
munity" 1986 in Amsterdam (23).

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	7
2.1.	Membranrezeptorpräparation	7
2.1.1.	Grobe Membranpräparation von Schweineschilddrüsen	7
2.1.2.	Membransolubilisierung unter Austestung verschiedener Detergentien	9
2.1.3.	Dichtegradienten-Elektrophorese des in verschiedenen Detergentien solubilisierten Membranmaterials auf Polyacrylamidgelen	10
2.2.	TDA-Assay: Überprüfung der Bindungseigenschaften solubilisierter Schweineschilddrüsenmembranen	13
2.2.1.	Praktische Durchführung des TDA-Assay	15
2.2.2.	Radioaktive Markierung und Präparation des rezeptorbindenden, bovinen 125-J-TSH	18
2.2.3.	Untersuchung von Einflußparametern auf die Bindung zwischen bovinem 125-J-TSH und porcinen Membranen im TDA	19
2.2.4.	Vergleich der Bindung von bovinem 125-J-TSH an porcine und humane Membranen	21
2.2.5.	Verdrängung von bovinem 125-J-TSH durch Patientenserum im porcinen und im humanen System	21
2.3.	Prinzip und praktische Durchführung des TGI-Assay	22
2.4.	Prinzip und praktische Durchführung des TSI-Assay	23
2.5.	IgG-Präparation aus Patientenserum	24
2.6.	Funktionsprüfung des IgG's sechs verschiedener Patientenserum im TDA-, TGI- und TSI-Assay	26
2.7.	Elektrophorese von solubilisierten Schweineschilddrüsenmembranen auf Dichtegradienten-Polyacrylamidgelen	28
2.7.1.	Gelherstellung: Polyacrylamid-Gradientengel nach dem diskontinuierlichen System nach Laemmli (26, 34)	28
2.7.2.	Elektrophoresebedingungen für das Polyacrylamid 4/20-Gradientengel	32
2.7.3.	Fixieren, Färben, Entfärben und Konservieren des PAA-Gels	33

3.	METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG VON OBERFLÄCHENANTIGENEN DER SCHILDDRÜSEN-ZELLE MITTELS HUMANER ANTIKÖRPER	34
3.1.	TSH-Rezeptor-Nachweis durch elektrophoretische Auftrennung eines Präinkubats von 125 -J-TSH, solub. Schilddrüsenmembranen und Human-IgG (Methode I)	34
3.1.1.	Inkubationsansatz und Elektrophorese	35
3.1.2.	Autoradiographie	36
3.2.	Immunoblotting solubilisierter Schilddrüsenmembranen mit Antigennachweis mittels humaner Antikörper (Methode II)	37
3.2.1.	Elektrophoreseproben	37
3.2.2.	Proteinblot	38
3.2.2.1.	Praktische Durchführung des Blots und Blottingbedingungen	38
3.2.2.2.	Immobilisierende Matrices	40
3.2.2.3.	Blottingkinetik: Quantitativer Transfer 125 -J-markierter Schweine-SD-Membranen vom Gel auf Zetabinde und Nitrocellulose in Abhängigkeit von der Zeit	41
3.2.2.4.	Färben der Matrix	41
3.2.3.	Antigennachweis	42
3.2.3.1.	Absättigen der Matrix	42
3.2.3.2.	Bovines 125 -J-TSH als 1. Ligand	43
3.2.3.3.	Bindungskinetik von bov. 125 -J-TSH an Zetabinde	43
3.2.3.4.	Hu-IgG als 1. Antikörper	44
3.2.3.5.	2. Antikörper	45
3.2.3.5.1.	2. Antikörper ohne Verstärkerprinzip	45
3.2.3.5.2.	2. Antikörper mit Verstärkerprinzip	47
3.2.4.	Überprüfung des Versuchssystems (3.2.) mit Hilfe von Thyreoglobulin-Antikörpern (=TgAk) und POD gekoppelten Anti-TgAk	49

3.3.	Immunextraktion von spezifisch bindendem 125-J-markiertem Antigenmaterial durch IgG-Affinitätschromatographie über Protein-A-Sepharose (Versuchsmethode III)	50
3.3.1.	Radioaktive Markierung von Schweine- schilddrüsenmembranen mit LPO und GOD	51
3.3.2.	Solubilisierung der 125-J-SSM	53
3.3.3.	Inkubationsansatz	53
3.3.4.	Chromatographie über Protein-A-Sepharose	54
3.3.5.	Elektrophorese und Autoradiographie	56
3.4.	Immunextraktion von spezifisch bindendem 125-J-markiertem Antigenmaterial durch IgG-Affinitätschromatographie über Protein-A-Sepharose bei modifizierter radioaktiver Markierung (Methode IV)	57
3.4.1.	Radioaktive Markierung porciner Follikelepithelzellen	59
3.4.2.	Zytolose und Solubilisierung	60
3.4.3.	Inkubationsansatz	61
3.4.4.	Chromatographie über Protein-A-Sepharose	62
3.4.5.	Aktivitätsmessung der spezifisch eluierten Proben	62
4.	ERGEBNISSE	63
4.1.	Effizienz verschiedener Detergentien bei der Membransolubilisierung (Methode: 2.1.2.)	63
4.1.1.	SDS	
4.1.2.	Zwittergent	65
4.1.3.	Zwittergent und Triton	65
4.1.4.	Triton	65
4.2.	Optimierung des TDA-Assay	69
4.2.1.	Einflußparameter der Bindung zwischen bovinem 125-J-TSH und porcinen Mem- branen im TDA (Methode: 2.2.3.)	69
4.2.2.	Vergleich der Bindung von bovinem 125-J-TSH an porcine und humane Membranen (Methode: 2.2.4.)	74
4.2.3.	Verdrängung von bovinem 125-J-TSH durch Patientenserum im porcinen und humanen System (Methode: 2.2.5.)	77

4.3.	Charakterisierung des IgG's von sechs Patientenseren im TDA-, TGI- und TSI-Assay (Methode: 2.6.)	
4.4.	Ergebnis der Autoradiographie von Versuchsmethode I: TSH-Rezeptor Nachweis durch elektrophoretische Auftrennung eines Präinkubats von 125-J-TSH, solubil. Schilddrüsenmembranen und Human-IgG (Methode: 3.1.)	
4.5.	Ergebnisse der Versuchsmethode II: Immunoblotting solub. Schilddrüsenmembranen mit Antigennachweis mittels humaner Antikörper (Methode: 3.2.)	84
4.5.1.	Blottingkinetik: Quantitativer Transfer 125-J-markierter Schweine-SD-Membranen vom Gel auf Zetabinde und Nitrocellulose in Abhängigkeit von der Zeit (Methode: 3.2.2.3.)	84
4.5.2.	Beispiel des Blots solubilisierter SSM und Blottingparameter (Methode: 3.2.2.)	86
4.5.3.	Bindungskinetik von bovinem 125-J-TSH an Zetabinde (Methode: 3.2.3.3.)	88
4.5.4.	Inkubation der geblotteten Matrix mit bovinem 125-J-TSH als ersten Liganden (Methode: 3.2.3.2.)	90
4.5.5.	Inkubation der geblotteten Matrix mit Hu-IgG als 1. Antikörper und Miles-Ak als 2. Antikörper (Methode: 3.2.3.4. und 3.2.3.5.1.)	92
4.5.6.	Inkubation der geblotteten Matrix mit Hu-IgG als 1. Ak und ABC-Vectastain ^R als 2. Ak (Methode: 3.2.3.4. und 3.2.3.5.2.)	93
4.5.6.1.	TDA ⁺⁺⁺ - und TDA ⁻ -Pool-IgG als 1. Ak	94
4.5.6.2.	TGI-positives Patienten-IgG (A 2) als 1. Ak	96
4.5.6.3.	TDA-positives IgG verschiedener Patienten als 1. Ak	96
4.5.7.	Inkubation der geblotteten Matrix mit TgAk als 1. Ak und Anti-TgAk-POD als 2. Ak (Methode: 3.2.4.)	97
4.6.	Ergebnis der Versuchsmethode III: Immunextraktion von spezifisch bindendem 125-J-markiertem Antigenmaterial durch IgG-Affinitätschromatographie über Protein-A-Sepharose (Methode: 3.3.)	99
4.7.	Ergebnis der Versuchsmethode IV: Immunextraktion von spezifisch bindendem 125-J-markiertem Antigenmaterial durch IgG-Affinitätschromatographie über Protein-A-Sepharose bei modifizierter radioaktiver Markierung (Methode 3.4.)	102

5.	DISKUSSION	106
6.	ZUSAMMENFASSUNG	123
7.	LITERATURVERZEICHNIS	127

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

BSA:	bovines Serumalbumin
cpm:	counts per minute
EGF:	epidermal-growth-factor
fKS:	fötales Kälberserum
GOD:	Glucoseoxidase
HMW:	high-molecular-weight-markerproteins
LMW:	low-molecular-weight-markerproteins
LPO:	Lactoperoxidase
MAK:	mikrosomale Antikörper
MG:	Molekulargewicht
NC:	Nitrocellulose
PAA:	Polyacrylamid
PBS:	phosphate-buffered-system
PEG:	Polyethylenglycol
POD:	Meerettich-Peroxidase
rpm:	rounds per minute
RT:	Raumtemperatur
SD:	Schilddrüse
SDS:	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SSM:	Schweine-Schilddrüsen-Membranen
TBII:	TSH-binding inhibitor immunoglobulins
TCA:	Trichloressigsäure
TDA:	Thyrotropin-Displacing-Activity Assay
TgAk:	Thyreoglobulin-Antikörper
TGI:	thyroid-growth-stimulating immunoglobulins
Tris:	2-Amino-2-Hydroxymethyl-1,3 Propandiol
TSH:	thyroid-stimulating-hormone
TSI:	thyroid-stimulating immunoglobulins
ZB:	Zetabinde

1. EINLEITUNG

Bei der Diagnostik von immunogenen Schilddrüsenerkrankungen, wie z.B. dem Morbus Basedow und der Hashimoto-Thyreoiditis, haben neben den klassischen Schilddrüsenantikörpern, den mikrosomalen und Thyreoglobulin-Antikörpern (4, 30), in den letzten Jahren die TSH-Rezeptor-Antikörper ein zunehmendes wissenschaftliches und zum Teil auch schon klinisches Interesse gewonnen (27, 29, 44, 51).

Es ist vor allen Dingen interessant, daß die TSH-Rezeptor-Antikörper offensichtlich keine einheitliche IgG-Klasse darstellen, sondern sich aus einem Spektrum verschiedener Gamma-Immunglobuline mit unterschiedlichen Angriffspunkten zusammensetzen.

Die Unterteilung der TSH-Rezeptor-Antikörper erfolgt pathophysiologisch in:

- **Thyroid-stimulating immunoglobulins (TSI):**

Sie imitieren die biologische Aktivität von TSH am Rezeptor und können so eine Hyperthyreose bei Patienten mit immunogenen Schilddrüsenerkrankungen hervorrufen. TSI bewirkt dabei eine Aktivierung der Adenylcyclase in der Schilddrüsenzellmembran, so daß eine vermehrte Synthese von cyclischem Adenosin 3', 5'-Monophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) resultiert (3, 37, 45, 47, 50).

- **TSH-binding inhibitor immunoglobulins (TBII):**

Diese blockierenden Antikörper inhibieren die Bindung von TSH am Rezeptor und können so durch Hemmung der cAMP-Freisetzung für eine Hypothyreose bei Patienten mit immunogenen Schilddrüsenerkrankungen verantwortlich sein (12, 15).



- **Thyroid-growth-stimulating immunoglobulins (TGI):**

Sie stimulieren das Wachstum der Schilddrüse (13, 14, 53). Der Nachweis, daß diese Immunglobuline als TSH-Rezeptor-Antikörper wirksam sind, ist bisher allerdings nicht erbracht worden. Neueste Veröffentlichungen stellen eher in Frage, daß der wachstumsstimulierende Effekt der TGI-Antikörper über den TSH-Rezeptor erfolgt (18, 19, 28).

Diese verschiedenen Angriffspunkte der TSH-Rezeptor-Antikörper können Veränderungen der Schilddrüsenfunktion im Verlaufe einer immunogenen Schilddrüsenerkrankung erklären:

Zum Beispiel können auftretende TSI-Antikörper eine Hyperthyreose, TBII-Antikörper dagegen eine Hypothyreose bei Autoimmunthyreoiditis hervorrufen. Die TGI-Antikörper könnten das Phänomen erklären, warum bei einigen Patienten mit M. Basedow eine enorme Strumabildung auftritt, während andere - zum Teil thyreotoxische - Basedowpatienten keine Vergrößerung der Schilddrüse vorzuweisen haben. Auch Typenwandel im Verlauf der Erkrankung, z.B. ein Übergang von der Hashimoto-Thyreoiditis in den M. Basedow (bezeichnet als Hashimototoxicosis), ließen sich durch Veränderungen des Gamma-Immunglobulin-Spektrums im Verlaufe der Erkrankung erklären.

Ein Verfahren zum Nachweis von TSH-Rezeptor-Antikörpern wurde 1977 von B.R. Smith (44) entwickelt und in den folgenden Jahren optimiert (41, 43, 46): Mit Hilfe eines Radiorezeptorassays, des sogenannten Thyrotropin-Displacing-Activity-Assay (TDA), ist es möglich TSH-verdrängende Antikörper in den Seren von Patienten mit immunogenen Schilddrüsenerkrankungen nachzuweisen. Dabei wird gemessen, ob die Bindung von TSH an Schilddrüsenmembranen durch Patienten-IgG verdrängt werden kann.

Eine genauere Differenzierung der TSH-Rezeptor-Antikörper in thyroid-stimulating-(TSI), TSH-binding inhibitor-(TBII) oder thyroid-growth-stimulating immunoglobulins (TGI) erlaubt der TDA-Assay nicht. Diese Differenzierung hat gesondert zu erfolgen durch eine Funktionsprüfung präparierter Gamma-Immunglobuline von Patienten mit immunogenen Schilddrüsenerkrankungen im:

- TSI-Assay, der einen Anstieg von cAMP in Schilddrüsenzellen nach IgG-Stimulation anzeigt (4, 6, 37, 38, 39) und damit schilddrüsenstimulierende bzw. TSH-inhibierende Antikörper nachweist, sowie im
- TGI-Assay, in dem das Wachstum vitaler Schilddrüsen-Follikelzellen nach IgG-Stimulation durch Messung des Einbaus von ^3H -Thymidin in die DNA der Schilddrüsenzelle gemessen werden kann (14, 18, 21).

Bisher offen und in der Literatur nicht geklärt verbleiben für die TSH-Rezeptor-Antikörper die folgenden Fragen:

- Stellen die thyroid-growth-stimulating immunoglobulins wirklich TSH-Rezeptor-Antikörper dar, und wird damit das immunogen bedingte Wachstum der Schilddrüse über den TSH-Rezeptor vermittelt?
- Existieren bei immunogenen Schilddrüsenerkrankungen für verschiedene Antikörper auch unterschiedliche Antigenkomponenten der Schilddrüsenzellmembran, und damit eine Klärung der Frage, ob thyroid-stimulating immunoglobulins außer an den TSH-Rezeptor - wie vermutet - auch an weitere antigen wirkende Membranstrukturen angreifen.
- Sind bei unterschiedlichen Verlaufsformen des M. Basedow, z.B. mit bzw. ohne Hyperthyreose, Struma oder endokriner Ophthalmopathie, auch verschiedene Antikörperprofile gegen unterschiedliche Membranstrukturen der Schilddrüsenzelle zu erkennen?

Um der Beantwortung dieser Fragen näher zu kommen, war es nötig, eine Methode zur Darstellung von Oberflächenantigenen der Schilddrüsenzellmembran, unter anderem des TSH-Rezeptors, zu entwickeln. Methodisch kam hierfür eine hochauflösende Dichtegradienten-Elektrophorese in Betracht, um präparierte und solubilisierte Schweineschilddrüsenmembranen in - nach Molekulargewicht geordnete - Subfraktionen aufzutrennen, mit der anschließenden Untersuchung, ob "TSI- bzw. TGI-Seren" eine spezifische Antikörperbindung an bestimmte Membransubfraktionen aufweisen.

Das heißt, mit Hilfe der hochauflösenden Proteinelektrophorese sollte vordringlich:

- a) das Molekulargewicht des TSH-Rezeptors als vermutetes Membranantigen der Schilddrüsenzelle bestimmt werden
- b) der Angriffspunkt der TSH-Rezeptor-Antikörper an den elektrophoretisch aufgetrennten Membranproteinen untersucht werden unter der Fragestellung, in welchem Molekulargewichtsbereich das spezifisch bindende Antigen der Schilddrüsenzellmembran anzusiedeln ist
- c) nach Klassifizierung des Molekulargewichts des TSH-Rezeptors untersucht werden, ob die TGI-Antikörper, deren Reaktionsmechanismus noch diskutiert wird, wirklich an den TSH-Rezeptor binden
- d) sollte - soweit die Methodik es zuließe - untersucht werden, ob bei immunogen bedingten Schilddrüsenerkrankungen neben dem TSH-Rezeptor noch weitere Oberflächenantigene der Schilddrüsenzelle nachweisbar sind.

Folgende methodische Ansätze wurden dabei im Einzelnen durchgeführt:

- TSH-Rezeptor-Nachweis durch elektrophoretische Auftrennung eines Präinkubats von 125-J-TSH, solubilisierten Schilddrüsenmembranen und Human-IgG (Methode I):

In dieser Methode galt es, den TSH-Rezeptor anhand seiner Bindung an 125-J-TSH nachzuweisen und sein Molekulargewicht zu charakterisieren.

- Immunoblotting solubilisierter Schilddrüsenmembranen mit Antigennachweis mittels humaner Antikörper (Methode II):

Grob präparierte und solubilisierete Schweineschilddrüsenmembranen wurden nach elektrophoretischer Auftrennung auf Dichtegradientengelen auf eine immobilisierende Nylonmatrix gebロットet, auf der mittels humaner Antikörper und 125-J-TSH die spezifische Antikörperbindung an antigene Membranstrukturen untersucht werden konnte.

- Immunextraktion von spezifisch bindendem, 125-J-markiertem Antigenmaterial durch IgG-Affinitätschromatographie über Protein-A-Sepharose (Methode III):

Grob präparierte Schweineschilddrüsenmembranen wurden mit 125-Jod markiert, solubilisiert und anschließend mit humanen Antikörpern inkubiert. Der sich bildende 125-J-Antigen * Antikörper-Komplex wurde durch IgG-Affinitätschromatographie über Protein-A-Sepharose abgetrennt. Es folgten Elektrophorese und Autoradiographie des spezifisch eluierten Komplexes.

- Immunextraktion von spezifisch bindendem, ^{125}J -markiertem Antigenmaterial durch IgG-Affinitätschromatographie über Protein-A-Sepharose bei modifizierter radioaktiver Markierung (Methode IV):

Als Modifikation der letzt genannten Methode wurden intakte Schilddrüsen-Follikelzellen nach Blockade der Jodaufnahme (durch Perchlorat) mit ^{125}J -Jod radioaktiv markiert mit dem Ziel, einen Einbau des Jods in die Zelle zu verhindern und damit eine höhere Radiojodmarkierung spezifisch der Membranproteine an der Zelloberfläche zu erhalten. Es folgten die Membranpräparation aus den ^{125}J -markierten Schilddrüsenzellen, nachfolgend die Inkubation des gewonnenen radioaktiven Membranmaterials mit antikörperhaltigem Serum und abschließend die Elution des spezifischen ^{125}J -Antigen* Antikörper-Komplexes über Protein-A-Sepharose mit Aktivitätsmessung im Gamma-Counter.

2. MATERIAL UND METHODEN

Alle aufgeführten Chemikalien stammen - soweit nicht anders vermerkt - von der Firma Merck, Darmstadt.

2.1. Membranrezeptorpräparation

2.1.1. Grobe Membranpräparation von Schweineschilddrüsen

Material

a) Puffer:

- Homogenisierungspuffer A: 10 mM Tris-HCl, 50 mM Na₂-EDTA, 20 mM β -Mercaptoäthanol (Fa. Serva), 100 mg/ml Trypsininhibitor (Fa. Sigma, USA);
pH 7,4
- Puffer B : 10 mM Tris-HCl, pH 7,4

b) Geräte:

- Hettich Roto-Silent K - Kühlzentrifuge
- Beckman Spinco Zentrifuge Typ 50, Rotor-Typ 50
- Moulinex-Homogenisator, Fa. Moulinex
- Lyophilisiergerät, Fa. Christ, Oosterode

Die Präparation erfolgte in Anlehnung an Evans (16).

Zum Prinzip der Schilddrüsenmembranpräparation durch Homogenisieren und Zentrifugieren siehe Abbildung 1.

Praktische Durchführung

Die Schweineschilddrüsen wurden vom Münchner Schlachthof bezogen und sofort frisch weiterverarbeitet. Alle Präparationen und Auftrennungsschritte wurden bei 0°C bis +4°C durchgeführt. Das Schilddrüsenengewebe wurde von angrenzenden Muskel-, Fett- und Bindegewebe sorgfältig abpräpa-

riert und mit dem Messer in erbsgroße Würfel zerschnitten. Pro 1 g Schilddrüsengewebe wurden 5 ml Homogenisierungspuffer A hinzugegeben. Die Suspension wurde dann im Mixer ca. 10 Sekunden homogenisiert und das gewonnene Homogenisat mit Hilfe einer Saugflasche über Nylonseidengaze filtriert. Das gesamte Filtrat wurde 10 min. bei 500 g in einer Hettich-Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Aufschwimmende Gewebereste, sowie Fett wurden weitgehend mit dem Spatel entfernt, die Überstände vorsichtig in Zentrifugenröhrchen dekantiert und erneut für 10 min. bei 500 g zentrifugiert. Die Überstände wurden dann in Beckman-Ultrazentrifugen-Röhrchen dekantiert und für 20 min. bei 13 000 g und 4°C in der Beckman-Ultrazentrifuge mit dem Rotor-TI 50 zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugierungsschritt wurden die Überstände verworfen, die verbliebenen Pellets zum Waschen in je 1 ml Puffer B aufgenommen und mit Pasteurpipetten suspendiert, anschließend die Zentrifugenröhrchen ganz mit Puffer B aufgefüllt. Die Proben wurden erneut für 20 min. bei 13 000 g und 4°C zentrifugiert. Nach Dekantieren der Überstände wurden die gewaschenen Pellets in Puffer B resuspendiert: pro 3 g des Ausgangsgewichtes des Schilddrüsengewebes wurden 1 ml Puffer hinzugegeben, so daß man 3 g Schilddrüsengewichtsäquivalente pro ml (= 3 g Äqu. SD) erhielt. Anschließend wurden die grob präparierten Membranen in 500 µl Aliquots aufgeteilt, lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung im gefriergetrockneten Zustand bei -20°C aufbewahrt.

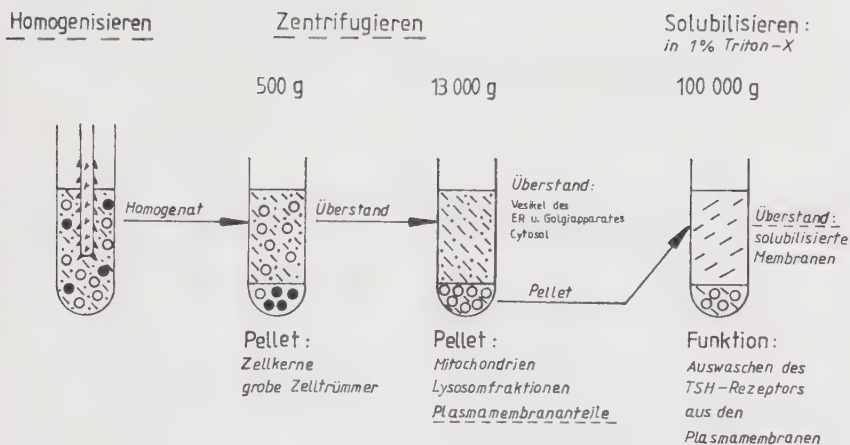


Abbildung 1: Schilddrüsenmembranpräparation
Membrantrennung durch Zentrifugieren

2.1.2. Membransolubilisierung unter Austestung ver- schiedener Detergentien

Material

- Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS), Fa. Serva
- β -Mercaptoäthanol, Fa. Serva
- Zwittergent^R, Fa. Calbiochem-Hoechst
- Triton-X-100, Fa. Serva
- Lösungspuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4

Prinzip

Das Solubilisieren der Schilddrüsenmembranen hat die Funktion, die in der Plasmamembran eingebetteten Proteine mit Hilfe eines Detergens aus ihrer biologischen Umgebung herauszulösen. Dabei ist die Wahl des Detergens für eine optimale Ausbeute an Membran- bzw. Rezeptormaterial von entscheidender Bedeutung. (10)

Praktische Durchführung

Für den Solubilisierungsschritt wurden drei Detergentien ausgetestet (siehe Abbildung 2):

- A) **SDS**: ein streng ionisches Detergens, das die Quartär- und Tertiärstruktur der Proteine denaturiert.
- B) **Zwittergent**: bestehend aus einem negativen und positiven Pol, sowie einem hydrophoben Anteil.
- C) **Triton-X-100**: ein lipophiles Detergens.

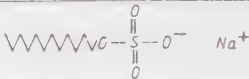
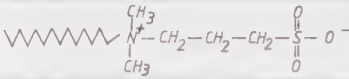
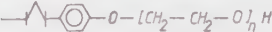
Name :	Strukturformel :	Detergentstyp :
SDS (= Sodium Dodecylsulfat)		streng ionisch
Zwittergent (= Sulfobetain)		bipolar
Triton-X-100 (= Polyoxyethylen - Octylphenol)		lipophil

Abbildung 2: Übersicht verschiedener Solubilisierungsdetergentien

Die in 500 µl Aliquots portionierten, lyophilisierten Membranen wurden je in 500 µl Solubilisierungslösung resuspendiert: Solubilisierungslösung für Ansatz

- A) a) 10 mM Tris-HCl, 1 % SDS
b) 10 mM Tris-HCl, 1 % SDS, 5 % β -Mercaptoäthanol und
Probe 10 min. bei 100°C erhitzen
- B) 10 mM Tris-HCl, 10 mM Zwittergent
- C) 10 mM Tris-HCl, 1 % Triton-X-100
- D) 10 mM Tris-HCl, 0,2 % Triton-X-100,
10 mM Zwittergent

Alle Ansätze pH 7,4 gepuffert.

Die Inkubation der Proben erfolgte ca. 15 min. bei 4°C unter Rühren. Abschließend wurden die Membranen in der Beckman-Ultrazentrifuge (Rotor-TI 50) für 30 min. bei 100 000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthält die solubilisierten, TSH-rezeptorhaltigen Membranproteine.

2.1.3. Dichtegradienten-Elektrophorese des in verschiedenen Detergentien solubilisierten Membranmaterials auf Polyacrylamidgelen

Material

- Polyacrylamid-Gradientengele: PAA 4/30, Fa. Pharmacia, Schweden
- Elektrophoresekammer GE - 4, Fa. Pharmacia
- Spannungsgerät: LKB - Biochrom - 2103 Power Supply, Fa. LKB
- Eichproteine: High Molecular Weight (HMW) Calibration Kit for Electrophoresis, Fa. Pharmacia

Praktische Durchführung

Zur qualitativen Überprüfung des solubilisierten Membranmaterials wurden Elektrophoresen auf Polyacrylamid-Gelen mit einem Konzentrationsgradienten von 4 - 30 % (PAA 4/30) durchgeführt. Die Gele wurden hierzu über Nacht im jeweiligen Detergenspuffer inkubiert; für

Ansatz A) in 0,375 M Tris-HCl-pH 8,8 + 0,1 % SDS

Ansatz B) in 0,375 M Tris-HCl-pH 8,8 + 5 mM Zwittergent

Ansatz C) in 0,375 M Tris-HCl-pH 8,8 + 0,1 % Triton

Ansatz D) in 0,375 M Tris-HCl-pH 8,8 + 0,1 % Triton
u. 5 mM Zwittergent

Als Elektrophoresepufer wurde eine 0,025 M Tris und 0,192 M Glycin-HCl, pH 8,8, Lösung verwendet. Im Falle der SDS-Elektrophorese wurde der Puffer zusätzlich mit 0,1 % SDS versetzt.

Die Elektrophoresen liefen im vertikalen System mit einem 15minütigen ersten Vorlauf bei 125 V, 50 mA und 10°C, um so eventuelle Verunreinigungen aus dem Gel auszuscheiden. Anschließend wurden 10 µl solubilisiertes Membranmaterial aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurden hochmolekulare Proteine, die einen Molekulargewichtsbereich von 670 000 - 67 000 Dalton abdeckten, aufgetragen. Es folgte ein zweiter Vorlauf für 20 min. bei 70 V, um die Proben langsam ins Gel einwandern zu lassen. Die elektrophoretische Auftrennung wurde schließlich bei 125 V, 50 mA und 10°C für ca. 15 Stunden durchgeführt.

Der Nachweis der Proteine erfolgte durch Färbung mit 0,1 % Coomassie-Blue (näheres siehe 2.7.3).

Die elektrophoretische Auftrennung der in 1 % Triton-X solubilisierten Schilddrüsenmembranen zeigte nach Coomas-

sie-Blue-Färbung die sauberste Auftrennung mit den meisten Proteinbanden (siehe 4.1.), so daß in allen weiteren Versuchen Triton-X in einer Konzentration von 1 % als Solubilisierungsdetergens verwendet wurde.

Die Proteinbestimmung der in 1% Triton-X solubilisierten Schilddrüsenmembranen erfolgte nach der Biuret-Methode am Filterphotometer Abbott-VP (Firma Abbott, USA): Die in Triton solubilisierten Membranen hatten eine Proteinkonzentration von 3 mg/ml bei einer Pufferkonzentration von 20 mM Tris und 1 % Triton.

Um eine Anreicherung und stabile Lagerung des solubilisierten Membranmaterials zu erreichen, wurden 500 µl Aliquots der in Triton solubilisierten Schilddrüsenmembranen lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Bindungsversuche im TDA-Assay zeigten, daß die solubilisierten Membranen in diesem Zustand bis zu maximal zwei Monaten haltbar waren, während nicht-lyophilisiertes solubulisiertes Membranmaterial, das bei 0°C oder Raumtemperatur aufbewahrt wurde, einen raschen Bindungsverlust aufwies (siehe: 4.2.1.).

2.2. TDA-Assay: Überprüfung der Bindungseigenschaften solubilisierter Schweineschilddrüsenmembranen

Prinzip

Der Thyrotropin-Displacing-Activity Assay (TDA-Assay) ist ein Radiorezeptorassay. Er beruht darauf, daß die Bindung von TSH an seinen Hormonrezeptor kompetitiv durch Gamma-Immunglobuline aus Patientenseren, die TSH-Rezeptor-Antikörper enthalten, gehemmt werden kann. (Siehe dazu auch Abbildung 3.) Das Ausmaß der TSH-Verdrängung wird nach Standardisierung durch eine TSH-Eichkurve bestimmt.

Prinzip des TDA-Assay:

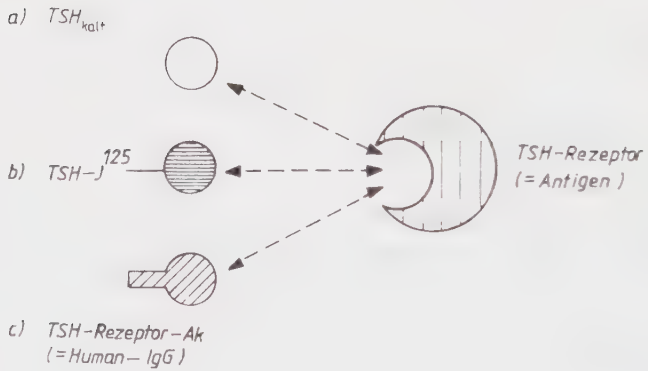


Abbildung 3: Prinzip des TDA-Assay:
 Kompetitive Hemmung der Bindung von $^{125}\text{-J-TSH}$
 an den TSH-Rezeptor durch kaltes TSH und
 TSH-Rezeptor-Antikörper

2.2.1. Praktische Durchführung des TDA-Assay

Die methodische Ausführung erfolgte in Anlehnung an das Labor von Herrn Dr. Witte und unter Modifizierung der Literaturstellen (41) und (46).

Material

- in 1 % Triton solubilisierete Schweineschilddrüsenmembranen (siehe 2.1.)
- bovines TSH (Thyreostimulin^R, Fa. Organon) für
 - a) radioaktive Markierung zu 125-J-TSH mit 7000 - 10 000 cpm/100 µl
 - b) TSH-Standarddeichkurve mit : 0.49, 1.95, 7.81, 31.25, 125 mE TSH/ml Nullserum (= Serum ohne TSH-Rezeptor-Ak)
- 30 % PEG-4000 in 1,5 M NaCl und 15 % PEG-4000 in 0,75 M NaCl und 0,1 % bSA
- 16-Kanal-Gamma-Zähler, NE 1600, Fa. Nuclear Enterprises

1) Probe:

- a) bov. TSH-Standard gelöst in Nullserum (Serum ohne TSH-Rezeptor Ak)
- b) Patientenseren mit Verdacht auf TSH-Rezeptor-Ak

2) Membranen:

solubilisiert in 1 % Triton-Y

3) bov. 125-J-TSH:

mit 7000 - 10 000 cpm/100 µl

Inkubationsansatz

- 50 µl Probe (TSH-Standard bzw. Serumprobe)
- + 50 µl Membranen

- 15 min. kalte Vorinkubation bei Raumtemperatur
- + 100 µl bov. TSH-Tracer

- 45 min. bei 37°C inkubieren
- mit 500 µl 10 mM Tris-HCl-Puffer-pH 7,4 auffüllen
- + 750 µl 30 % PEG-4000 in 1,5 M NaCl

- 10 min. in Hettich-Zentrifuge bei 4000 rpm zentrifugieren
- Überstand absaugen
- Nachwaschen: Pellet in 1 ml 15 % PEG-4000 in 0,75 M NaCl u. 0,1 % BSA resuspendieren, 10 min. bei 4000 rpm zentrifugieren, Überstand absaugen
- Pellet für 8 Minuten im Gamma-Counter zählen.

Bestimmung der unspezifischen Bindung (N):

- 50 µl Nullserum (Serum ohne TSH-Rezeptor-Ak)
- + 50 µl Membranpuffer (ohne Membranproteine)
- + 100 µl bov. TSH-Tracer

Alle Proben wurden in Doppelwerten angesetzt. Die Auswertung erfolgte mittels Spline-Approximation (35). Der Wert der spezifischen Bindung ergab sich aus der Differenz der Gesamtbindung (= B_0 : ausgedrückt in Prozent der Ausgangsaktivität T) und der unspezifischen Bindung (N), also:

$$\text{spezif. Bindung} = \frac{B_0 - N}{T} \times 100 \%$$

Abbildung 4 zeigt das Beispiel einer TDA-Standardkurve.

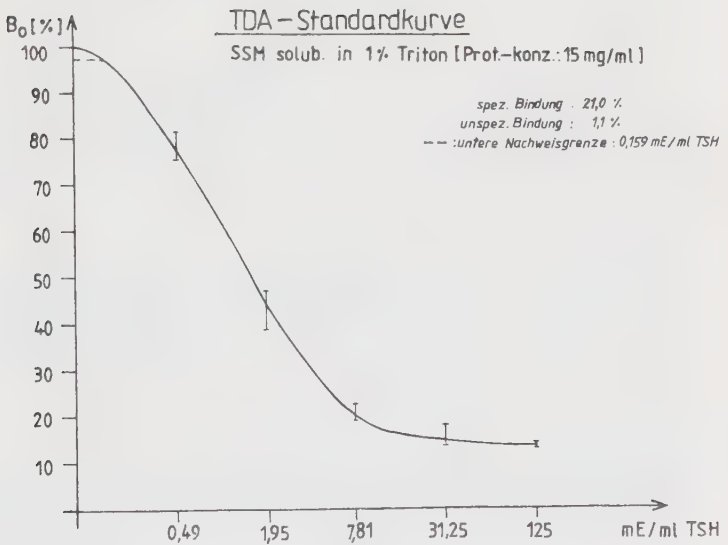


Abbildung 4: TDA-Standardkurve solubilisierter Schweine-SD-Membranen mit 15 mg/ml Protein.
Spezif. Bindung: 21 %, unspezif. Bindung: 1,1 %, untere Nachweisgrenze: 0,159 mE/ml TSH, 50 %-Intercept: 1,495 mE/ml TSH.

2.2.2. Radioaktive Markierung und Präparation des rezeptorbindenden, bovinen 125-J-TSH

Material

- bov. TSH (Thyreostimulin^R), Fa. Organon
- Na J¹²⁵
- Lactoperoxidase (LPO), Fa. Boehringer, Mannheim :
1 mg/ml in 0,1 M Na-Acetatpuffer, pH 6,5
- H₂O₂ (Perhydrol^R), Fa. Serva: 0.002 % gelöst in aqua dest.
- Stopplösung: 1,6 g Saccharose + 0,1 g KJ + 0,002 g NaN₃ gelöst in 10 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4
- Sephadex G-50- und Sephadex G-100-Gel; Fa. Pharmacia

Prinzip

Bovines TSH wird enzymatisch mit Lactoperoxidase radioaktiv markiert, der Hormonpeak durch Chromatographie eluiert und anschließend mit grobpräparierten Schweine-Schilddrüsen-Membranen inkubiert, um so das rezeptorbindende 125-J-TSH herauszusondern.

Praktische Durchführung

2,5 µg bovines TSH (gelöst in 5 µl 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,4) wurden mit 20 µl 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 versetzt, sowie 1 mCi frisches 125-Natrium-Jodid und 5 µg Lactoperoxidase hinzugefügt. Nach Zugabe von 5 µl frisch bereitetem H₂O₂ (0,002 %) wurde ca. 3 sec. auf dem Vortex gemischt und die Reaktion mit 100 µl Stopplösung beendet.

Die Probe wurde dann auf eine 15 cm Sephadex G-50-Säule aufgetragen und mit 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 eluiert. Fraktionen von ca. 1,3 ml wurden gesammelt.

Zur Anreicherung und Reinigung wurde der eluierte TSH-Peak (ca. Fraktion 5-10) mit 5 g Äquivalent grobpräparierten Schweineschilddrüsenmembranen für 30 min. bei 37°C unter Drehen inkubiert. Es wurde dann 1 min. bei 15000 g zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und die Aktivität des verbliebenen Pellets gezählt. Das Pellet wurde in 10 ml 10 mM Trispuffer pH 7,4 resuspendiert, erneut bei 15000 g zentrifugiert, der Überstand abgehoben, das Pellet gezählt und der Waschvorgang ein weiteres Mal wiederholt. Der Rückstand wurde dann in 2,0 M NaCl resuspendiert, 30 min. bei 4°C rotiert und anschließend bei 100000 g 30 min. ultrazentrifugiert.

Der abgehobene Überstand wurde bei 4°C über eine 50 cm Sephadex G-100-Säule mit 10 mM Trispuffer chromatographiert, und Fraktionen von je 5 ml aufgefangen. Die Fraktionen 9 - 14 enthielten im allgemeinen das Rezeptorbindende 125-J-bov.-TSH. Die Fraktionen wurden mit Trispuffer auf 6000 - 10000 cpm/100 µl verdünnt und so im Rezeptor-Assay eingesetzt.

2.2.3. Untersuchung von Einflußparametern auf die Bindung zwischen bovinem 125-J-TSH und porcinen Membranen im TDA

Überprüft wurde im TDA-Assay die Bindung von TSH an Schweine-Schilddrüsen-Membranen (SSM) in Abhängigkeit von:

- der Konzentration an Enzyminhibitoren im Homogenisierungspuffer
- der Proteinkonzentration der solubilisierten SSM
- der Stabilität der solubilisierten SSM
- dem Gefriertrocknen solubilisierter SSM

- Konzentration an Enzyminhibitoren im Homogenisierungspuffer

Zur Präparation der Schweineschilddrüsen wurde einmal Homogenisierungspuffer A mit 10 mM Tris, 50 mM Na_2EDTA , 20 mM β -Mercaptoäthanol und 100 mg/ml Trypsininhibitor pH 7,4 verwendet (siehe 2.1.). Zum anderen wurde ein Homogenisierungspuffer B, bestehend aus: 10 mM Tris, 5 mM Na_2EDTA , 2 mM β -Mercaptoäthanol und 100 mg/ml Trypsininhibitor pH 7,4 ausgetestet.

Die weitere Verarbeitung der Schilddrüsen erfolgte dann in beiden Ansätzen gleich wie unter 2.1. beschrieben. Die grobpräparierten Schilddrüsenmembranen wurden schließlich in 1 % Tritonlösung solubilisiert und in einer Proteinkonzentration von 3 mg/ml (=Schweineschilddrüsenmembranen in einfacher Proteinkonzentration = SSM 1x) in den TDA eingesetzt.

- Proteinkonzentration

Untersucht wurde die spezifische Bindung von solubilisierten Schweineschilddrüsen in einer Konzentration von:

- a) SSM 1,0 x = 3,0 mg/ml Protein; 1,0 % Triton
- b) SSM 2,5x = 7,5 mg/ml Protein; 2,5 % Triton
- c) SSM 5,0x = 15,0 mg/ml Protein; 5,0 % Triton

(SSM 1x, 2,5x, 5x: Schweineschilddrüsenmembranen mit 1-, 2,5 und 5facher Proteinkonzentration)

- Stabilität solubilisierter Membranen

Überprüft wurde das Bindungsverhalten von:

- a) SSM 1 x (3 mg/ml), die in 1 % Triton solubilisiert frisch in den TDA-Assay eingesetzt wurden
- b) SSM 1x (3 mg/ml), die nach dem Solubilisieren 24 Std. bei 4°C standen und
- c) SSM 1x (3 mg/ml), die nach dem Solubilisieren 24 Std. bei Raumtemperatur standen, bevor sie in den TDA-Assay eingesetzt wurden.

- Lyophilisieren

Die Membranen wurden einmal frisch nach dem Solubilisieren in einer Proteinkonzentration von 3 mg/ml im TDA untersucht. Im Vergleich dazu wurden solubilisierete Membranen, die ca. 1 Woche im gefriergetrockneten Zustand bei -20°C aufbewahrt und dann mit aqua dest. zu einer Proteinkonzentration von 3 mg/ml gelöst worden sind, im TDA-Assay überprüft.

2.2.4. Vergleich der Bindung von bov. 125-J-TSH an porcine und humane Membranen

Die Präparation der humanen Schilddrüsenmembranen erfolgte wie unter 2.1. beschrieben. Das menschliche Schilddrüsengewebe stammte aus Strumaresektionsmaterial. Verglichen wurde das Bindungsverhalten von bovinem TSH an in 1 % Triton solubilisierete, porcine und humane Membranen - jeweils von der gleichen Proteinkonzentration ausgehend: einmal von 15 mg/ml und zum anderen von 6 mg/ml in beiden Systemen.

2.2.5. Verdrängung von bov. 125-J-TSH durch Patientenserum im porcinen und im humanen System

Patientenserum wurden einmal mit solubilisiereten porcinen und zum anderen mit solubilisiereten humanen Schilddrüsenmembranen 15 min. bei Raumtemperatur vorinkubiert. Anschließend wurde boviner TSH-Tracer hinzugegeben und für weitere 45 min. bei 37°C inkubiert. Die Trennung von membrangebundenem und nicht gebundenem Material erfolgte durch Zentrifugieren; die verbliebene Aktivität des Pellets wurde im Gamma-Counter gezählt.

Die Verdrängung des TSH-Tracers vom TSH-Rezeptor durch die Patientenserum (vgl. Abb. 3) wurde festgelegt als prozentual verbliebene TSH-Bindungsaktivität - ausgehend von der Gesamtbindung (B_0) gleich 100 %. Werte unter 85% galten als TDA-positiv, wobei eine Verdrängung im Bereich von 80 - 85 % als fraglich bzw. schwach positiv galt: (+), Werte zwischen 60 - 80 % als einfach positiv +, zwischen 40 - 60 % als zweifach positiv: ++ und Werte zwischen 0 - 40 % als dreifach positiv: +++ bewertet wurden.

Die humanen und porcinen Membranen wurden in diesem Versuch jeweils so verdünnt, daß beide Systeme die gleiche spezifische Bindung von 11 % aufwiesen, bei einer unspezifischen Bindung von 3 - 4 %.

2.3. Prinzip und praktische Durchführung des TGI-Assay

Im TGI-Assay wird das Wachstum vitaler Schilddrüsen-Follikelzellen nach IgG-Stimulation durch Messung des Einbaus von ^3H -Thymidin in die DNA der Schilddrüsenzelle gemessen (20, 21, 22).

Kollagenase (Clostr. histolyticum) wurde in das arterielle Gefäßsystem intakter, frischer Schweineschilddrüsen - bei Okklusion der Schilddrüsenvenen - injiziert. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C konnten aus den infundierten Schilddrüsen isolierte Follikelzellen gewonnen werden, die gewaschen und in einem "minimal-essential-medium" (=MEM) unter Zusatz von 1 % fKS für 24 Std. vorinkubiert wurden. Eine definierte Menge Follikelzellen wurde nach mehrmaligem Waschen in MEM-Lösung überführt, die zusätzlich Hydrocortison (10 nM), Somatostatin (10 ng/ml), Transferin (5 µg/ml) sowie ^3H -Thymidin enthielt.

Präpariertes IgG in einer Endkonzentration von a) 2 mg/ml und b) 0.5 mg/ml wurde hinzugegeben und die Follikelzellen für weitere 72 Std. bebrütet. Das Zellwachstum ließ sich durch den Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA der Schilddrüsenfollikelzellen abschätzen. Daher wurden die Zellen anschließend mit TCA gefällt, lysiert und der Einbau des TCA-fällbaren ^3H -Thymidin im Beta-Counter gemessen. Die ^3H -Thymidin Zelleinbauraten korrelierte gut mit der Zellproliferation.

Vergleichend zu diesem Ansatz wurde der ^3H -Thymidin-Einbau in die Schilddrüsenzellen in IgG-freiem Testmedium bestimmt. Der hier gemessene ^3H -Einbau entsprach der **basalen** Wachstumsrate (= 100 % Stimulation). Wachstumsraten über 1,3 (= 130 % Stimulation) nach IgG-Zugabe (bei 2 mg/ml IgG-Endkonzentration) waren hinweisend für TGI-positives IgG.

2.4. Prinzip und praktische Durchführung des TSI-Assay

Im TSI-Assay wird gemessen, ob präpariertes Patienten-IgG eine Erhöhung des second messengers "cAMP" in Schilddrüsen-Follikelzellen herbeiführen kann (22, 39).

Für die Bestimmung der intra- und extrazellulären cAMP-Konzentration wurde eine definierte Menge präparierter Follikelzellen in einem Testmedium (= MEM u. 1 % fKS) kurz vorinkubiert und anschließend das präparierte IgG hinzugegeben. Nach Inkubation bei 37°C wurden die Follikel abzentrifugiert (30 sec. bei 10 000 g). Der Überstand wurde abgehoben und für die Bestimmung des extrazellulären cAMP-Spiegels aufbewahrt. Das Pellet mit den Follikelzellen wurde TCA gefällt. Die dadurch gewonnenen Zellextrakte wurden in wasserdampfgesättigtem Äther unter N_2 -Zufuhr bei 67°C evaporiert und in Wasser gelöst.

Der cAMP-Spiegel wurde dann in den gelösten Zellextrakten (intrazelluläres cAMP) und im abgehobenen Medium (extrazelluläres cAMP) mit Hilfe eines kommerziellen RIA-Kits (Becton und Dickinson) bestimmt.

Der Anstieg des cAMP durch präpariertes IgG wurde mit festen cAMP-Standards verglichen.

2.5. IgG-Präparation aus Patientenseren

Material

- Ammoniumsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Fa. Merck
- Dialysierschlauch: Thomapor^R-Rapid aus regenerierter Cellulose, Fa. Thomapor
- DEAE-Sephacel-Gel, Fa. Pharmacia
- Kollodiumhülsen^R, Fa. Sartorius

Prinzip

Es wurde das IgG aus den Seren von a) Patienten mit Morbus Basedow, b) Patienten mit nicht-iummunogener Schilddrüsenerkrankung bei stark wachsender, rezidivierender Struma und c) von gesunden Personen präpariert. Dazu wurden die Gamma-Immunglobuline durch Ammoniumsulfatfällung grob angereichert und nach Dialyse in einem säulenchromatischen Verfahren weiter aufgereinigt.

Praktische Durchführung

Zu 5 ml Serum wurden 1.22 g Ammoniumsulfat hinzugegeben und die Probe solange gerührt, bis sich das Ammoniumsulfat vollständig im Serum gelöst hatte. Die Probe wurde dann 15 min. bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand scharf abgesaugt und das verbliebene Pellet

mit den ausgefällten Immunglobulinen pro 1 ml Ausgangsserum in 100 μ l aqua dest. resuspendiert. Nach Lösen des Pellets wurde die Probe eine Stunde bei 4°C gegen Wasser dialysiert und 48 Stunden gegen 50 mM Tris-HCl pH 8,0 unter mehrmaligem Wechsel der Pufferlösung. Der Dialysierschlauch bestehend aus regenerierter Cellulose besaß eine Trenngrenze von 10 000 - 15 000 D, so daß die Immunglobuline mit 150 000 D Molekulargewicht zurückgehalten wurden, während Moleküle kleiner als 15 000 D in die Pufferlösung diffundieren konnten.

Der Dialyse folgte eine weitere Aufreinigung des IgG's durch Anionenaustausch--Chromatographie auf DEAE-Sephacel-Gel, das mit 50 mM Tris-HCl pH 8,0 äquilibriert war: Die dialysierte Probe wurde auf 5 cm DEAE-Sephacel Säulen aufgetragen, wobei pro Säule maximal das Dialysat aus 2,5 ml Menge des Ausgangsserums aufgetragen werden konnte. Die Elution des IgG's erfolgte mit 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0. Fraktionen von 1 ml wurden gesammelt (siehe Abbildung 5).

Ungebundenes Protein wurde anschließend mit 30 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer und 2 M NaCl pH 8,0 eluiert. Die Säulen wurden mit 15 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0 nachgewaschen. Der IgG-Peak (Fraktionen 1 - 8) wurde gepoolt und mit Kollodiumhülsen gegen 0,9 % NaCl auf ca. 1 ml eingengt.

Die Proteinbestimmung des präparierten IgG's wurde nach der Biuret-Methode am Abbott-VP-Filterphotometer (Fa. Abbott, USA) durchgeführt. Die IgG-Proben wurden nach der Proteinbestimmung so in 0,9 % NaCl verdünnt, daß sie eine Endkonzentration von 20 mg/ml hatten.

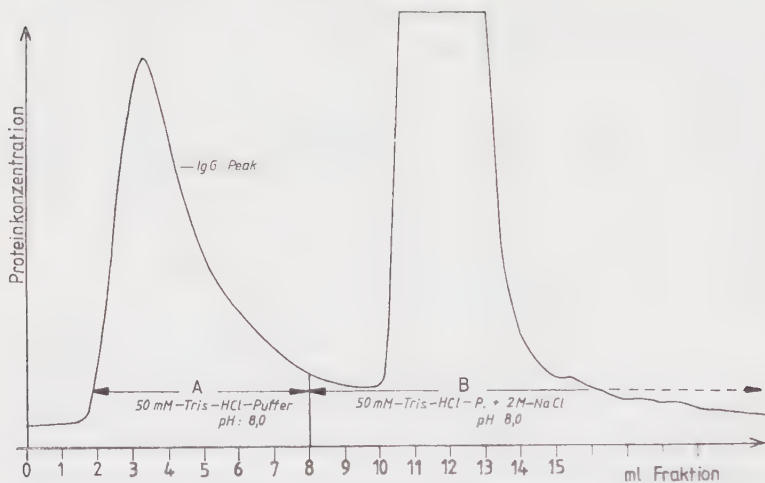


Abbildung 5: Elution des Hu-IgG's durch Anionenaustausch-Chromatographie

2.6. Funktionsprüfung des IgG's sechs verschiedener Patientenserum im TDA-, TGI- und TSI-Assay

In dieser Funktionsprüfung des IgG's sollte vor allem die Gruppe der thyroid-growth-stimulating immunoglobulins näher untersucht werden, mit dem Ziel abzuklären, ob "TGI" über den TSH-Rezeptor wirksam sind.

Dazu wurde das Serum von sechs Patienten ausgewählt, die alle schnell wachsende und rezidivierend auftretende Strumen besaßen. Es waren zwei Krankheitsgruppen vertreten:

Gruppe A: 2 Patienten mit nicht-immunogener Schilddrüsenerkrankung bei stark wachsender, rezidivierender nodöser oder diffuser Struma.

Pat. A 1: w, nodöse Riesenstruma trotz T_3/T_4 -Therapie

Pat. A 2: w, 2-malige Strumaresektion und erneutes Wachstum trotz T_3/T_4 -Gabe.

Gruppe B: 4 Patienten mit immunogener Schilddrüsenerkrankung vom Typ des Morbus Basedow bei gleichzeitiger Rezidivstruma.

Pat. B 1: w, + aktive endokrine Ophthalmopathie, Ø Behandlung

Pat. B 2: m, + aktive endokrine Ophthalmopathie, T_3/T_4 -Therapie

Pat. B 3: w, keine endokrine Ophthalmopathie, Ø keine Behandlung

Pat. B 4: w, + aktive endokrine Ophthalmopathie, Ø Behandlung

Das Serum dieser Patienten wurde in drei Tests untersucht:

- 1) Im TDA-Assay wurde überprüft, ob das Serum dieser Patienten TSH-Rezeptor-Antikörper enthält. Verwendet wurden für den TDA in 1 % Triton solubilisierte Schweineschilddrüsenmembranen. Die spezifische Bindung des Rezeptor-Assays betrug 24 %, die unspezifische Bindung 3 %. Zur Beurteilung des TDA siehe 2.2.5..
- 2) Im TGI-Assay wurde untersucht, ob das aus den Patientenserum präparierte IgG eine wachstumsstimulierende Wirkung auf Schweine-SD-Follikelzellen hat. Zum Prinzip siehe 2.3..
- 3) Im TSI-Assay wurde untersucht, ob das präparierte Patienten-IgG eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in Schweine-SD-Follikelzellen herbeiführen kann. (Prinzip: siehe 2.4.).

2.7. Elektrophorese von solubilisierten Schweineschild- drüsenmembranen auf Dichtegradienten-Polyacrylamid- gelen

Zur Molekulargewichtsaufftrennung der solubilisierten Schilddrüsenmembranen wurde die Elektrophorese im vertikalen System (siehe Abbildung 7) unter nicht denaturierten Bedingungen eingesetzt.

2.7.1. Gelherstellung: Polyacrylamid-Gradientengel nach dem diskontinuierlichen System nach Laemmli (26,34)

Da sich in den folgenden Versuchen die käuflichen Gradientengele (PAA 4/30, Fa. Pharmacia) wegen ihrer Dicke und ihres geringen Auftragungsvolumens von maximal 20 µl pro Auftragsstelle als ungeeignet erwiesen, wurden selbstgefertigte Gradientengele verwendet.

Materialien

- LKB-Gradientenmischer, Fa. LKB, Schweden
- Peristaltikpumpe, Fa. Reichelt Chemietechnik, Heidelberg
- Acrylamid, Fa. Serva
- N,N'-Methylenbisacrylamid, Fa. Serva
- Ammoniumpersulfat, Fa. Serva
- Tetramethyläthylendiamin (= TMED), Fa. Serva

I. Stocklösungen

Zur Herstellung der Polyacrylamidgele bei einer Gelabmessung von 14 cm Länge, 18 cm Breite und 1,5 mm Dicke

Lösung A: (Polyacrylamidlösung: T = 40 %, C = 2,5 %)

Acrylamid : 39,0 g
N,N-Methylenbisacryl: 1,0 g
Glycerin : 25,0 ml

ad 100 ml aqua dest.

Lösg. A filtrieren und dunkel bei 4°C
aufbewahren

Lösung B: (Polymerisationskatalysatoren)

- a) 10 % Ammoniumpersulfatlösung (=APS)
b) TMED

Lösung C: (Pufferlösung)

1,5 M Tris-HCl-Puffer pH 8,8

II. Verdünnungslösungen

1) Abschlußgel: 40 %:

4 ml Lösg. A + 10 µl APS + 5 µl TMED

2) Trenngel: 4 - 20 %:

a) Dichte Lösung (H) = 20 % b) Leichte Lösung (L) = 4 %

8 ml Lösg. A	1,6 ml Lösg. A
4 ml Lösg. C	4,0 ml Lösg. C
4 ml H ₂ O	10,4 ml H ₂ O
+	+
40 µl APS	40,0 µl APS
10 µl TMED	10,0 µl TMED

Zugabe im Gradientenmischer

Endkonzentration:

- Dichte Lösg. : 20 % Polyacrylamid, 0,325 M-Tris-HCl-pH 8,8
- Leichte Lösg.: 4 % Polyacrylamid, 0,325 M-Tris-HCl-pH 8,8

3) Sammelgel: 4 %

1 ml Lösg. A + 0,5 ml Lösg. C + 8,5 ml H₂O + 10 µl Triton-X
abgleichen mit rauchender HCl auf pH 6,8
Zugabe von 100 µl APS + 10 µl TMED

Endkonzentration:

4 % PAA, 0,075 M Tris, 0,1 % Triton, pH 6,8

Praktische Durchführung der Gelherstellung (siehe auch Abbildung 6):

Das Gel hatte an der Unterkante ein 1 cm langes Abschlußgel bestehend aus 40 % Polyacrylamid ohne Detergenszusatz. Es folgte im Mittelteil das eigentliche Trenngel über eine Länge von ca. 10 cm mit einem kontinuierlichen PAA-Gradienten von 4 - 20 % pH 8,8, ebenfalls ohne Detergenszusatz. Die Oberkante bestand aus einem ca. 3 cm langen Sammelgel mit 4 % PAA - pH 6,8 und Zusatz von 0,1 % Triton-X. Der saure pH des Sammelgels hatte die Funktion, die Proben vor ihrem Eintritt in das Trenngel zu konzentrieren, so daß die Startfront der Proben sauber wurde.

Zwei gereinigte Glasplatten mit den Abmessungen: 14 cm Länge und 18 cm Breite wurden am Rand durch einen elastischen Silikonschlauch U-förmig abgedichtet. Seitlich rechts und links wurden Abstandshalter mit 1,5 mm Dicke eingebracht, die gleichzeitig als Halterung fungierten.

Mit einer Spritze wurden 4 ml der 40%igen Polyacrylamidlösung vorgegossen und nach Polymerisation der kontinuierliche Dichtegradient von 4 - 20 % mit Hilfe eines Gradientenmischers und einer Peristaltikpumpe darübergeschichtet.

Der Gradientenmischer funktionierte nach dem Prinzip der kommunizierenden Röhren: Zwei Zylinder waren über einen U-förmigen, verschließbaren Kanal miteinander verbunden.

In den vorderen Zylinder wurde bei geschlossenem Verbindungskanal die dichte, 20%ige PAA-Lösung gefüllt, in den hinteren die leichte, 4%ige PAA-Lösung. Unter gleichmäßigem Rühren im vorderen Zylinder wurde über ein Schlauchsystem mit Hilfe der Peristaltikpumpe etwas dichte Lösung bei maximalem flow zwischen die beiden Glasplatten eingepumpt. Anschließend wurde der Verbindungskanal geöffnet, so daß die 4%ige Lösung in den vorderen Zylinder einströmte und dadurch die 20%ige PAA-Lösung herunterverdünnte.

Nach der Polymerisation des Trenngels wurde der Probenkamm (= "slot-former") mit 24 Positionen à 100 µl Fassungsvolumen auf die Oberkante aufgesteckt und das 4%ige Sammelgel mit einer Spritze aufgegossen.

Das Gel wurde bei Raumtemperatur in Pufferlösung aufbewahrt und sollte vor Gebrauch mindestens 12 Stunden polymerisieren.

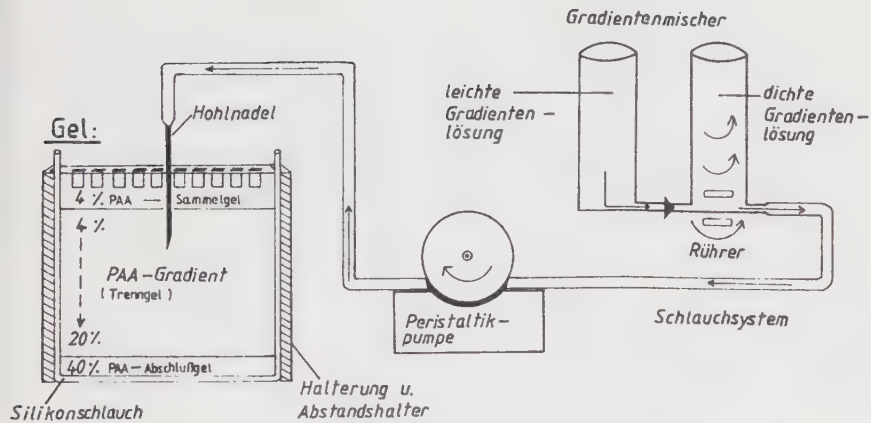


Abbildung 6: Herstellung eines Polyacrylamid-Gradienten-Gels nach dem diskontinuierlichen System nach Laemmli

2.7.2. Elektrophoresebedingungen für das Polyacrylamid 4/20-Gradientengel

Material

- Elektrophoresekammer GE-4, Fa. Pharmacia
- Spannungsgerät, LKB-Biochrom 2103 Power Supply, Fa. LKB

Zum Prinzip der Elektrophorese im vertikalen System siehe Abbildung 7.

Praktische Durchführung

Der Elektrophoresepuffer (3.0 l) bestand aus einer 0.025 M Tris-HCl und 0.192 M Glycin - pH 8,8 Lösung.

Nach Einbringen des PAA 4/20-Gels in die Halterung wurden die obere und untere Kammer mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Vor der Probenauftragung wurde ein erster Vorlauf für 15 min. bei 200 V, 50 mA und 10°C Kühlung gestartet, um Verunreinigungen und geladene, reaktionsfähige Substanzen aus dem Gel zu entfernen. Nach der Probenauftragung erfolgte ein zweiter Vorlauf für 20 min. bei 100 V, 20 mA und 10°C und schließlich die elektrophoretische Auftrennung für 15 - 20 Stunden bei 200 V, 50 mA und 10°C Kühlung.

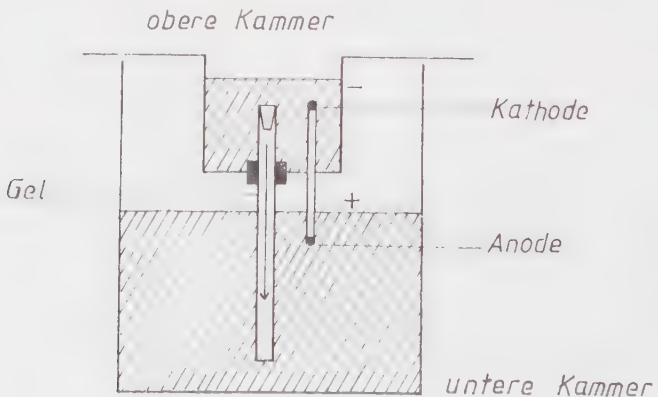


Abbildung 7: Prinzip der Elektrophorese im vertikalen System

2.7.3. Fixieren, Färben, Entfärben und Konservieren des PAA-Gels

Material

- Fixierlösung : 25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure
- Färbelösung : 0,1 % Coomassie Blue in 30 % Äthanol und 10 % Essigsäure
- Entfärbelösung : 30 % Äthanol, 10 % Essigsäure
- Konservierlösung: 30 % Äthanol, 10 % Essigsäure und 10 % Glycerin

Zur Darstellung der Proteinbanden des Gels erfolgte die Färbung mit Coomassie Blue (Serva-Blau R, Nr. 35051, Fa. Serva): Das Gel wurde 30 min. in Fixierlösung gebadet, über Nacht gefärbt und unter mehrmaligem Wechseln der Entfärbelösung für mindestens sechs Stunden entfärbt.

Zum Konservieren wurde das Gel über Nacht in glycerinhaltiger Konservierlösung inkubiert und daraufhin in Folie luftdicht eingeschweißt.

3. METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG VON OBERFLÄCHENANTI- GENEN DER SCHILDDRÜSENZELLE MITTELS HUMANER ANTIKÖRPER

3.1. TSH-Rezeptor-Nachweis durch elektrophoretische Auf- trennung eines Präinkubats von 125 -J-TSH, solub. Schilddrüsenmembranen und Human-IgG (Methode I)

Der Versuch wurde in der Vorstellung unternommen, auf diese Weise das Molekulargewicht des TSH-Rezeptors sicher ermitteln zu können.

Hochradioaktives 125 -J-TSH wurde mit TSH-Rezeptormaterial, sowie mit TDA-positivem und TDA-negativem Hu-IgG inkubiert (siehe auch Abbildung 8). Die Proben wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und die Auftrennung autoradiographisch dargestellt. Im Vergleich dazu wurde das 125 -J-TSH alleine aufgetrennt, um anhand der Molekulargewichtsdifferenz zum 125 -J-TSH*TSH-Rezeptor-Komplex den Hormonrezeptor klassifizieren zu können.

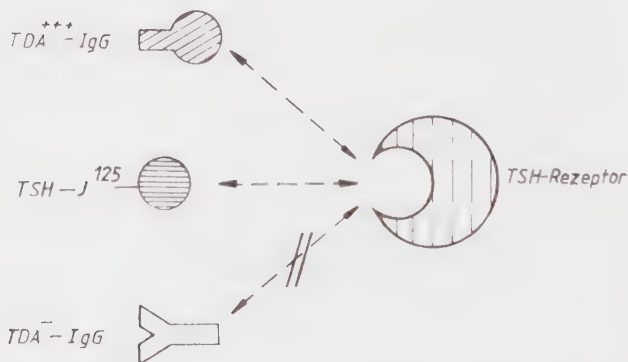


Abbildung 8: Reaktionsmodell zu Versuchsmethode I:
Kompetitiver Angriff von TDA⁺⁺⁺-IgG und
 125 -J-TSH am TSH-Rezeptor

3.1.1. Inkubationsansatz und Elektrophorese

Material

- solub. Schweine-Schilddrüsen-Rezeptormaterial (= SSM): mit einer Proteinkonzentration von 40 mg/ml gelöst in Probenpuffer
- Probenpuffer: 10 mM Tris-HCl, 20 % Glycerin, 0,1 % Bromphenolblau pH 7,4
- bovines 125-J-TSH mit 180 000 cpm/100 μ l = 0,082 μ Ci/100 μ l
- TDA⁺⁺⁺-Pool-IgG (20 mg/ml)
- TDA⁻-Pool-IgG (20 mg/ml)

Inkubationsansatz

Probe 1: 100 μ l b. 125-J-TSH + 100 μ l Probenpuffer

Probe 2: 100 μ l b. 125-J-TSH + 100 μ l SSM

Probe 3: 100 μ l b. 125-J-TSH + 100 μ l SSM + 100 μ l TDA⁺⁺⁺-IgG

Probe 4: 100 μ l b. 125-J-TSH + 100 μ l SSM + 100 μ l TDA⁻-IgG

Das Schilddrüsenmembranmaterial und Hu-IgG wurden 15 min bei RT vorinkubiert, dann bovines 125-J-TSH hinzugegeben und die Proben für weitere 45 min. bei 37°C - wie im TDA-Assay - inkubiert. Probe 1 und 2 wurden 45 min. bei 37°C inkubiert.

Die Proben wurden nach der Inkubation elektrophoretisch auf PAA 4/20-Gelen (siehe 2.7.1.) aufgetrennt, indem jeweils Aliquots von 50 μ l Probe nach kurzem Verlauf repetitiv aufgetragen wurden, bis das gesamte Probenvolumen auf dem Gel aufgebracht war.

Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V, 50 mA und 10°C für 19 Stunden. Das Gel wurde anschließend fixiert, über Nacht in glycerinhaltiger Lösung konserviert (siehe 2.7.3.) und in feste, dünne Kunststoff-Folie eingeschweißt.

Neben den Proben aus dem Inkubationsansatz wurden hochmolekulare Eichproteine im Gel mitaufgetrennt, die gesondert vom Probenlauf 1 - 4 fixiert und angefärbt wurden.

3.1.2. Autoradiographie

Material

- Röntgenfilm: Kodak Ortho-H Röntgenfilm, Fa. Kodak
- Röntgenkassette mit grün-emittierender Verstärkerfolie

Die Autoradiographie ist eine Methode, um radioaktive Substanzen mit Hilfe ihrer Photoaktivität sichtbar zu machen und zu messen (17).

Der in dünne Kunststoff-Folie eingeklebte Gelabschnitt mit dem Probenlauf 1 - 4 wurde in der Dunkelkammer auf den Röntgenfilm aufgelegt und der Film für 14 Tage in einer Röntgenkassette mit grün-fluoreszierender Verstärkerfolie belichtet.

Verwendet wurde ein Röntgenfilm mit mittlerem Kontrast und hoher Empfindlichkeit, abgestimmt auf die Verwendung grün-emittierender Verstärkerfolien. Die untere Nachweisgrenze des Films lag bei ca. $0.01 \mu\text{Ci}/\text{cm}^2 = 22000 \text{ cpm}/\text{cm}^2$ (nach Angaben des Herstellers). Dieser Wert begründet auch, warum der bovine TSH-Tracer im Inkubationsansatz so konzentriert verwendet werden mußte.

3.2. Immunoblotting solubilisierter Schilddrüsenmembranen mit Antigennachweis mittels humaner Antikörper (Methode II)

Diese Methode bestand in der elektrophoretischen Auftrennung der in Triton solubilisierten Schweine-Schilddrüsenmembranen und dem anschließenden Blot der Proben auf eine immobilisierende Matrix, auf der mittels präpariertem IgG oder bovinem TSH-Tracer die spezifische Antikörperbindung an antigene Membranstrukturen untersucht werden konnte.

3.2.1. Elektrophoreseproben

Material

- Eichproteine
 - a) High Molecular Weight (HMW) Calibration-Kit
 - b) Low Molecular Weight (LMW) Calibration-Kit
for Electrophoresis, Fa. Pharmacia

500 µl gefriergetrocknete solubilisierter Schweine-SD-Membranen wurden in 100 µl Probenpuffer bestehend aus 20 % Glycerin und 0,1 % Bromphenolblau (Fa. Serva) resuspendiert, so daß eine Membrankonzentration von 15 mg/ml Protein, 5 % Triton und 50 mM Tris (= SSM: 5x) resultierte. Pro Auftragsposition des Gels wurden 50 µl Membransuspension aufgetragen, was - von der Proteinmenge her - im TDA-Assay einer spezifischen Bindung von 20 % entsprach. Höhere Mengen an Membranmaterial waren nicht mehr auftrennbar gewesen.

Parallel dazu wurden ein hoch- und ein niedermolekularer Eichkit aufgetragen, so daß ausgehend von Thyreoglobulin (669000 D) über Ferritin (440000 D), Catalase (232000 D),

Lactat-Dehydrogenase (140000 D), Phosphorylase b (94000 D), Albumin (67000 D), Ovalbumin (43000 D), Carbonic Anhydrase (30000 D), Trypsininhibitor (20100 D) und Alpha-Lactalbumin (14400 D) ein Molekulargewichtsbereich von 670000 bis 14400 Dalton zur Erstellung einer Eichkurve abgedeckt war.

Die Laufbedingungen waren wie unter 2.7.2. beschrieben.

3.2.2. Proteinblot

Prinzip

Proteinblot ist der Transfer von im Gel elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine immobilisierende Matrix, an der die Proteine gebunden und mittels Färbung oder Inkubation spezifischer Antikörper nachgewiesen werden können. Der Proteinblot kann a) per Diffusion durch Puffersog oder b) elektrophoretisch erfolgen. Näheres zur Entwicklung und Anwendung des Proteinblottings siehe unter (7, 9, 25, 40, 53).

3.2.2.1. Praktische Durchführung des Blots und Blottingbedingungen

Material

- LKB 2005 Transphor Electroblotting Unit, Fa. LKB
- immobilisierende Matrices:
 - Nitrocellulose, Fa. Schleicher & Schuell
 - Zeta-Probe-Blotting-Membranes, Fa. Bio-Rad
- Filterpapier, flache Schwämme

Direkt im Anschluß an die Elektrophorese wurde der Teil des Gels mit den Laufbahnen der Schilddrüsenmembranen luftblasenfrei auf die mit Blottingpuffer angefeuchtete immobilisierende Matrix aufgelegt. Das Paket wurde seitlich durch mehrere Lagen - in Blottingpuffer angefeuchtetes - Filterpapier und flache Schwämme zusammengepreßt, mit einem Haltegitter versehen und als "Sandwich" in die Blottingkammer eingesetzt, die mit 5 Liter Blottingpuffer gefüllt war (siehe Abbildung 9, Schema des Proteinblots). Der Blottingpuffer bestand aus 0.025 M Tris und 0.192 M Glycin pH 8,8 und entsprach damit dem Elektrophoresepuffer (siehe 2.7.2.).

Der Gelabschnitt mit den Laufbahnen der Markerproteine dagegen war vor dem Blot abgetrennt worden und wurde zur Erstellung einer Molekulargewichts-Eichkurve mit Coomassie Blue angefärbt (wie unter 2.7.3. beschrieben).

Das Proteinblotting oder besser die Querelektrophorese der Membranen erfolgte elektrisch bei einer Spannung von 70 V, so daß die Membranproteine im alkalischen Blottingpuffer von minus nach plus in Richtung auf die immobilisierende Matrix wanderten, die anodenseitig plaziert war. Für die verwendeten Polyacrylamid-Gele von 1,5 mm Dicke hatte sich als Blottingdauer ein Zeitraum von 3 - 4 Stunden als optimal herausgestellt bei 70 V, 500 - 1000 mA und 0°C Kühlung.

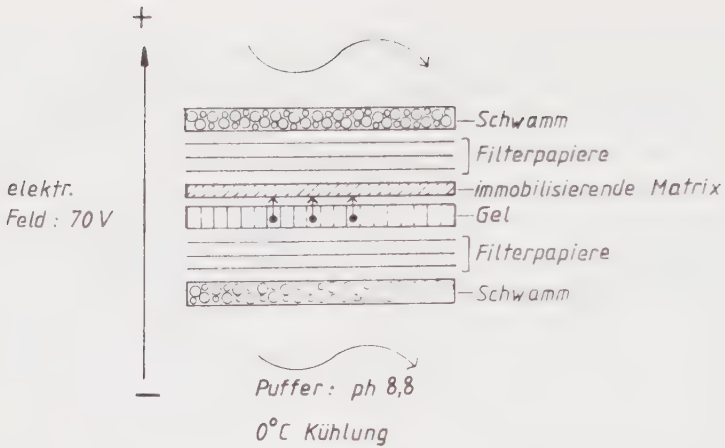


Abbildung 9: Schema des Proteinblottings bei elektro-
phoretischem Blot

3.2.2.2. Immobilisierende Matrices

Verwendet wurde einmal Nitrocellulose (mit einer Porengröße von 0,45 μm): ein auf Cellulosebasis aufgebautes und mit Salpetersäure verestertes Papier. Die Art der Proteinbindung ist unbekannt; man nimmt an, daß hydrophobe Wechselwirkungen eine Rolle spielen.

Zum anderen wurde Zetabinde (=Zeta-Probe-Blotting-Membranes, Fa. Bio-Rad) mit einer Porengröße von 0,45 μm verwendet; Zetabinde ist eine Nylonmembran mit positiver Ladung.

3.2.2.3. Blottingkinetik: Quantitativer Transfer 125-J-markierter Schweine-SD-Membranen vom Gel auf Zetabinde und Nitrocellulose in Abhängigkeit von der Zeit

125-J-markierte Schweine-SD-Membranen (Herstellung siehe 3.4.1.) wurden nach elektrophoretischer Auftrennung auf PAA-Gradienten-Gelen (siehe 2.7.1.) über 1, 2, 3, 4 und 6 Stunden auf doppellagige Nitrocellulose (= NC) und doppellagiges Zetabinde (= ZB) geblottet.

Die erste Matrix lag unmittelbar dem Gel an, die zweite Matrix wurde hinter die erste Matrix plaziert um zu prüfen, ob und in welchem Umfang diese "immobilisierenden" Matrices proteindurchlässig sind. Die Messung der Radioaktivität der Matrices erfolgte im Gamma-Counter. Die auf die Matrix transferierte Aktivität der Membranen (= A) wurde prozentual mit der auf das Gel aufgetragenen Ausgangsaktivität (= A_0) verglichen: Prozentualer Transfer = $\frac{A}{A_0} \times 100 \%$.

Aufgrund der besseren Transferergebnisse wurde im Folgenden fast ausschließlich Zetabinde verwendet (siehe 4.5.1.).

Weiterhin wurde untersucht, ob eine nach Proteinblot mit 0,5 % Glutaraldehyd fixierte Matrix eine höhere Bindungskapazität besitzt als eine nicht fixierte Matrix.

3.2.2.4. Färben der Matrix

Die Färbung der Matrix erfolgte mit Eisenchlorid und Tannin modifiziert nach (24).

Zur direkten Darstellung der Proteinbanden auf der Matrix wurde, wenn kein Antigennachweis vorgesehen war, die

Matrix fixiert und angefärbt: Sie wurde für 30 min. in Fixierlösung - bestehend aus 25 % Isopropanol und 10 % Essigsäure - inkubiert, gründlich in aqua dest. gespült und anschließend für 5 - 10 min. in einer 0,2 % FeCl_2 -Lösung inkubiert. Nach Zwischenwaschen in aqua dest. erfolgte eine 8-stündige Färbung in einer 1 %igen Tanninlösung.

3.2.3. Antigennachweis

3.2.3.1. Absättigen der Matrix

Nach Blot wurde die Matrix vorsichtig vom Gel abgezogen und die noch vorhandenen freien Proteinbindungsstellen der Matrix in einer Proteinlösung über 12 Stunden bei 4°C abgesättigt. Die Absättigungslösung bestand im Falle der Nitrocellulose aus 3 % BSA, bei Verwendung von Zeta-binde - aufgrund der höheren Bindungskapazität (siehe 4.5.1.) - aus 6 % BSA gelöst in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4.

Als Absättigungslösungen waren ebenso unverdünntes fötales Kälberserum (Fa. Serva), sowie 1 %iges bovines Hämoglobin (Fa. Serva) ausgetestet worden. Verwendet wurde schließlich bovines Serumalbumin.

Nach dem Absättigungsschritt wurde die Matrix 10 min. in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 unter 3maligem Wechseln des Puffers gewaschen.

Es folgte die Inkubation der Matrix mit dem 1. Liganden. Als erster Ligand können fungieren: einmal boviner TSH-Tracer und zum anderen aus Patientenserum präpariertes IgG.

3.2.3.2. Bovines 125-J-TSH als 1. Ligand

Auf eine saubere Glasplatte wurde hochaktiver boviner TSH-Tracer (mit 20000 cpm/100 μ l) pipettiert. Die Matrix wurde mit ihrer Proteinseite auf die Tracerflüssigkeit gelegt, so daß sie gleichmäßig mit 125-J-TSH in Berührung kam, und bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer für 2 Stunden inkubiert. Die Inkubationszeit ergab sich aus der unter 3.2.3.3. beschriebenen Bindungskinetik von 125-J-TSH an Zetabinde.

Das Zetabinde wurde anschließend 10 min. in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 unter mehrmaligem Wechseln des Puffers gewaschen und nach Abtropfen auf Filterpapier gleichmäßig in 0,5 cm Abschnitte zerschnitten, deren Aktivität im Gamma-Counter gemessen wurde.

Die Darstellung der Aktivitätsverteilung erfolgte anhand der in der Elektrophorese mitgelaufenen Markerproteine.

3.2.3.3. Bindungskinetik von bov. 125-J-TSH an Zetabinde

Ziel dieser Untersuchung war es, die optimale Inkubationsdauer des bov. TSH-Tracers an die an Zetabinde gebundenen Schilddrüsenmembranen zu ermitteln.

Ausgestanzte Zetabindeplättchen mit einem Durchmesser von 1 cm wurden mit Blottingpuffer angefeuchtet. Nach Abtropfen auf Filterpapier wurden jeweils 50 μ l Probe auf die Plättchen pipettiert und zwar:

- a) Blottingpuffer als Nullwert bzw. Maß der unspezifischen Bindung,
- b) solub. Schweine-SD-Membranen mit 3 mg/ml Proteinkonzentration und 1 % Triton (= SSM 1x) und
- c) solub. Schweine-SD-Membranen mit 15 mg/ml Proteinkonzentration und 5 % Triton (= SSM 5x).

Nach Inkubation der Proben wurden die Zetabindeplättchen über Nacht bei 4°C in einer 6 %igen BSA-Lösung abgesättigt und überschüssiges Protein durch 10minütiges Waschen in 10 mM Phosphatpuffer entfernt. Die Plättchen wurden dann auf einer Glasplatte in einer feuchten Kammer mit jeweils 10 µl bovinem TSH-Tracer (= 6500 cpm/100 µl) über eine Zeitspanne von 15 Minuten, 1, 2, 4 und 7 Stunden inkubiert. Danach wurden die Plättchen gründlich in 10 mM Phosphatpuffer gewaschen und die verbliebene Aktivität für 60 sec. im Gamma-Counter gemessen.

3.2.3.4. Hu-IgG als 1. Antikörper

Auf eine Glasplatte wurde präpariertes Hu-IgG mit 5 mg/ml Konzentration pipettiert. Das Zetabinde mit den geblotteten SD-Membranen wurde mit seiner Proteinseite auf die IgG-Lösung gelegt, so daß sie gleichmäßig von der Globulinlösung bedeckt war. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer für 2 Stunden bei RT.

Ausgetestet wurden folgende IgG-Präparationen:

- TDA-dreifach-positives IgG, das aus einem Pool von Seren stammte
- TDA-zweifach-positives IgG, ebenfalls ein gepooltes IgG
und als Kontrolle
- TDA-negatives Pool-IgG
- Als TGI-positives IgG wurde ein Patientenserum verwendet, das im TGI-Test eine Wachstumsstimulation der Follikelzellen um Faktor sechs bewirkte (siehe 4.3, Serum A 2).

Nach Inkubation mit dem Hu-IgG wurde die Matrix erneut 10 min. gewaschen und mit dem 2. Antikörper inkubiert.

3.2.3.5. 2. Antikörper

Als 2. Antikörper wurde ein System mit und ein System ohne Verstärkerprinzip ausgetestet.

Material

- Miles-Antikörper: Horseradish Peroxidase Conjugated Anti-Human IgG, Fa. Miles-Yeda LTD., Israel
- Vectastain ABC Kit (Human IgG), Fa. Vector Laboratories, USA
- 4-Chloronaphtol, Fa. Merck, Darmstadt

3.2.3.5.1. 2. Antikörper ohne Verstärkerprinzip

Dieser 2. Antikörper von der Firma Miles bestand aus Anti-Human-IgG (von der Ziege) gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase (POD).

Der 2. Ak wurde 1:250 in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 vorverdünnt und die Matrix mit der verdünnten Lösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 10minütigem Waschen der Matrix in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und weiteren 5 Minuten in 50 mM Na-Acetat pH 5,0 wurden die POD gekoppelten Moleküle mit Chloronaphtol und Wasserstoffsuperoxid angefärbt.

Herstellung der Farblösung

60 mg 4-Chloronaphtol gelöst in 20 ml Methanol
+ 100 ml 50 mM Na-Acetat pH 5,0
+ 50 µl H_2O_2 (30 %) kurz vor Gebrauch hinzugeben
Die Färbung der Matrix erfolgte unter Sicht in einer dunklen Kammer, da der Farbstoff lichtempfindlich war und bei Lichtexposition rasch zerfiel.

Abbildung 10 verdeutlicht die Reaktionsweise dieses 2. Antikörpers: Hu-IgG reagiert mit dem Schilddrüsenmembranantigen; Hu-IgG wiederum wird durch Anti-Hu-IgG erkannt, das mit POD gekoppelt ist. Durch eine Farbreaktion am POD-Molekül läßt sich dann der Reaktionskomplex färberisch lokalisieren.

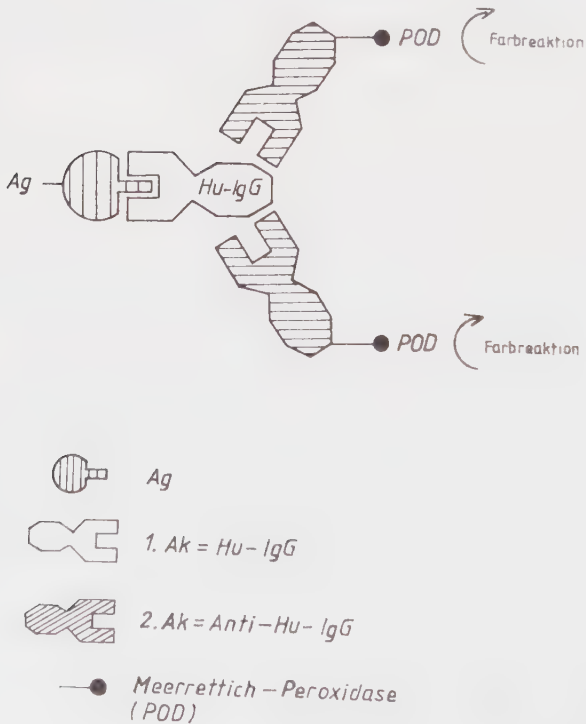


Abbildung 10: Reaktionsschema des 2. Antikörpers ohne Verstärkerprinzip

3.2.3.5.2. 2. Antikörper mit Verstärkerprinzip

Aufgrund der Ergebnisse mit dem Miles-Ak wurde ein 2. Antikörper mit Verstärkerprinzip (1,48) verwendet - in der Vorstellung dadurch eine höhere Nachweisempfindlichkeit zu erreichen. Dieser 2. Ak (Vectastain ABC Kit, Fa. Vector Laboratories) bestand aus einem Anti-Hu-IgG - Avidin - Biotin - System. Das Prinzip ist in Abbildung 11 dargestellt.

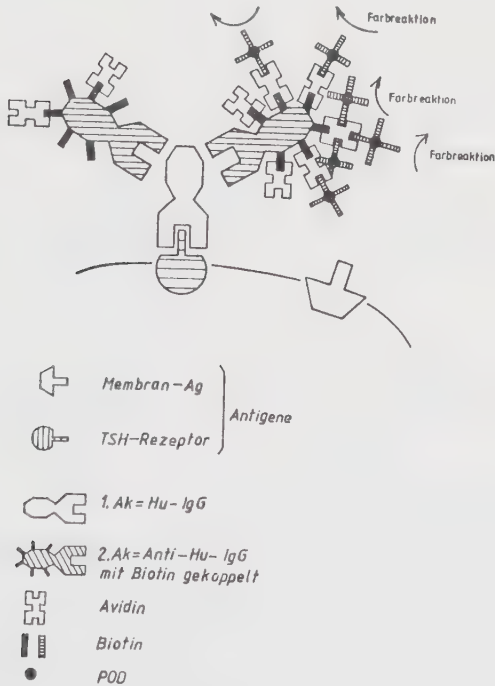


Abbildung 11: Reaktionsschema des 2. Ak mit Verstärkerprinzip

Prinzip

Hu-IgG als 1. Ak reagiert mit seinem Membranantigen. Hu-IgG selbst wird durch Anti-Hu-IgG (von der Ziege) gebunden, das mit sechs Molekülen des niedermolekularen Vitamins Biotin gekoppelt ist. Mit Biotin reagiert Avidin, das 4 Bindungsstellen für Biotin besitzt, so daß noch 3 freie Bindungsstellen für Biotin am Avidinmolekül vorhanden sind. Diese freien Bindungsstellen werden durch Biotinmoleküle besetzt, die mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind. Nach Farbreaktion am POD-Molekül würde man so eine theoretische Verstärkung um den Faktor 36 erhalten (siehe Abbildung 12).

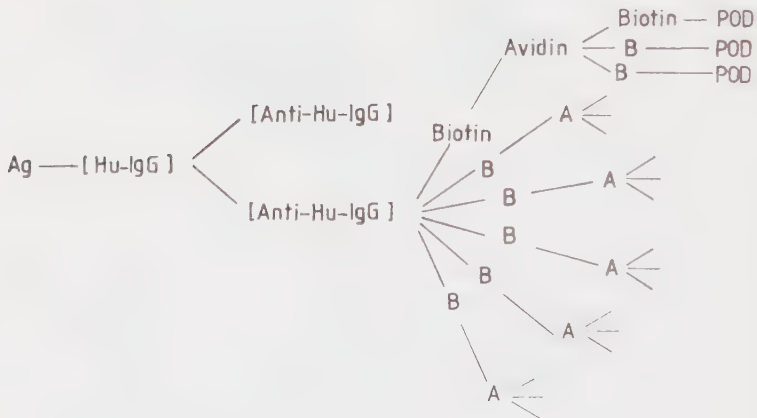


Abbildung 12: ABC-Verstärkersystem:
theoretischer Verstärkungsfaktor: 36fach

Avidin ist ein Glycoprotein von 68 000 D Molekulargewicht, das z.B. im Hühnereiweiß vorkommt. Es besitzt eine enorm hohe Bindungskapazität zu Biotin von über 10^{15} M^{-1} und übertrifft damit die Affinität der meisten Antigene und ihrer Antikörper um mehr als eine Million, so daß man von einer praktisch irreversiblen Bindung zwischen Avidin und Biotin ausgehen kann.

Praktische Durchführung

Die Matrix wurde 40 min. bei RT auf einer Glasplatte in einer feuchten Kammer mit Lösung A des 2. Antikörpers inkubiert, die aus dem mit Biotin gekoppeltem Anti-Hu-IgG bestand: Zur Herstellung der Lösung A wurden 90 µl Anti-Hu-IgG*Biotin in 2,5 ml 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 gelöst. Nach einem Waschschriff im Phosphatpuffer erfolgte die Inkubation der Matrix mit Lösung B des 2. Antikörpers, einer Avidin-Biotin-POD-Lösung, für 30 min. bei RT. Zur Herstellung der Lösung B wurden 150 µl Avidin und 150 µl POD-gekoppeltes Biotin zu 2,5 ml 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 zugesetzt und vor Gebrauch mindestens 20 min. bei RT präinkubiert. Die Matrix wurde anschließend wieder in 10 mM Phosphatpuffer, sowie 50 mM Na-Acetat pH 5,0 gewaschen und mit Chloronaphtol (siehe 3.2.3.5.1.) angefärbt.

3.2.4. Überprüfung des Versuchssystems (3.2.) mit Hilfe von Thyreoglobulin-Antikörpern (= TgAk) und POD gekoppelten Anti-TgAk

Solubilisierte Schweine-Schilddrüsenmembranen wurden elektrophoretisch aufgetrennt bei einer Gesamtmenge an Protein pro Auftragsstelle von 30 µg. Dies entsprach ca. 1/20 der Menge, die für den Antigennachweis des TSH-Rezeptors bei Patienten mit immunogenen SD-Erkrankungen verwendet worden war' (hier ca. 600 - 700 µg Protein pro Auftragsstelle). Die Membranproteine wurden nach der Elektrophorese auf Zetabinde geblottet, die Matrix dann mit 6 % bSA abgesättigt, 10 min. in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 gewaschen und mit dem 1. Ak, einem gegen Schweine-Thyreoglobulin gerichteten Gamma-Immunglobulin vom Meer-schweinchen (= TgAk), für 2 Stunden bei RT in einer

feuchten Kammer inkubiert. Hierzu war der 1. Ak 1:200 in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 vorverdünnt worden. Nach Zwischenwaschen in Phosphatpuffer erfolgte eine 2stündige Inkubation bei RT mit dem 2. Ak, einem POD gekoppeltem "Anti-Meerschweinchen-Thyreoglobulin-Ak" vom Kaninchen (=Anti-TgAk), der 1:200 verdünnt war. Die Matrix wurde anschließend gewaschen und mit Chloronaphtol (siehe 3.2.3.5.1.) angefärbt.

Trotz der wesentlich geringeren Ausgangsmenge an Schilddrüsenmembranproteinen waren in diesem Falle auf der Matrix eindeutig Banden von der Hintergrundfärbung abgrenzbar.

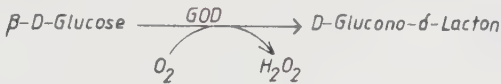
3.3. Immunextraktion von spezifisch bindendem 125-J-markiertem Antigenmaterial durch IgG-Affinitätschromatographie über Protein-A-Sepharose (Versuchsmethode III)

Grob präparierte Schweineschilddrüsenmembranen wurden mit 125-J markiert, solubilisiert und anschließend mit humanen Antikörpern inkubiert. Der sich bildende 125-J-Antigen*Antikörper-Komplex wurde durch IgG-Affinitätschromatographie über Protein-A-Sepharose abgetrennt. Es folgten Elektrophorese und Autoradiographie des spezifisch eluierten Komplexes.

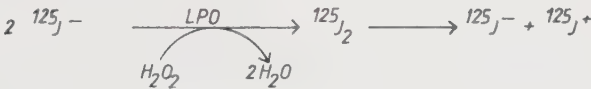
3.3.1. Radioaktive Markierung von Schweineschilddrüsenmembranen mit LPO und GOD

Zum Prinzip siehe Abbildung 13.

1) Oxidation von Glucose unter H_2O_2 -Synthese :



2) Oxidation von Jodid Ionen :



3) Elektrophile Reaktion zwischen $^{125}\text{J}^+$ und

a) Tyrosin- b) Histidin-Resten :

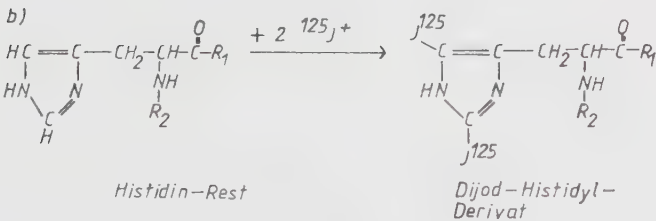
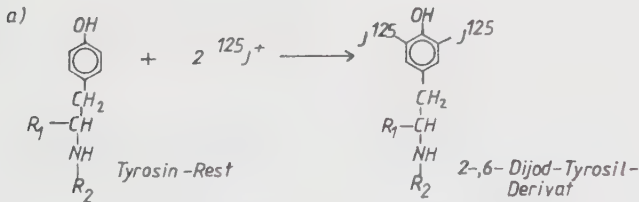


Abbildung 13: Prinzip der enzymatischen Jodierung der Schilddrüsenmembranproteine mit GOD und LPO

Materialien für die radioaktive Markierung von SSM

- 2500 µl grobpräpariertes, lyophilisiertes Schweinemembranmaterial mit 3 g Äquivalent-SD
- Glucose (Fa. Merck): 110 mM in 0.12 M H_3PO_4 , pH 7,4
- Lactoperoxidase (Fa. Boehringer): 0.75 U/ml in 0.12 M H_3PO_4 , pH 7,4
- Glucoseoxidase (Fa. Boehringer): 0.05 U/ml in 0.12 M H_3PO_4 , pH 7,4
- Thiamazol (Fa. Degussa): 5 mg/ml in 0.12 M H_3PO_4 , pH 7,4
- Na J^{125} mit 2.22 µg J/ml und 11-17 mCi/µg J.

Alle Reagenzien wurden ohne das Bakteriostatikum NaN_3 angesetzt.

Praktische Durchführung

2500 µl grobpräparierte, lyophilisierte Membranen wurden in 2500 µl 0.12 M H_3PO_4 und 0.15 M NaCl-Pufferlösung pH 7,4 resuspendiert und 20 min. bei 13000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 2000 µl 0.12 M Phosphatpuffer pH 7,4 gelöst. Für die Markierung wurden die 2000 µl Membranen mit 50 µl Glucose (110 mM) und 100 µl Lactoperoxidase (0.75 U/ml) versetzt, sowie 50 µl frisches Na J^{125} mit 1.5 mCi hinzugegeben. Die Jodierungsreaktion wurde mit 100 µl Glucoseoxidaselösung (0.05 U/ml) gestartet und der Probenansatz für 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Thiamazol (5 mg/ml) beendet.

Um überschüssiges Jod und Enzymmaterial auszuwaschen, wurden die markierten Membranen für 20 min. bei 13000 g und 4°C in der Beckman-Ultrazentrifuge zentrifugiert, der Überstand abgehoben und das Pellet mit 5 ml 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 erneut bei 13000 g für 20 min. nachgewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die verbliebene Aktivität des Pellets im Gamma-Counter gemessen.

3.3.2. Solubilisierung der 125-J-SSM

Das radioaktiv markierte Pellet wurde in 600 µl Solubilisierungspuffer bestehend aus 0,2 % Triton in 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 resuspendiert und für 30 min. bei 100 000 g und 4°C in der Beckman-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand mit den solubilisierten 125-J-SSM (Proteinkonz. ca. 4 mg/ml) wurde vorsichtig abgehoben und mit dem 20 mM Tris-Puffer so verdünnt, daß eine Probenaktivität von ca. 2×10^6 cpm pro 100 µl solubilisierter 125-J-SSM resultierte.

3.3.3. Inkubationsansatz

Material

- solub. 125-J-SSM mit 2×10^6 cpm/100 µl $\hat{=}$ 0,9 µCi/100 µl
- TDA⁺⁺⁺-Pool-IgG: 20 mg/ml
- TDA⁻-Pool-IgG: 20 mg/ml
- bov. TSH_{kalt} : 100 mU/10 µl (Thyreostimulin, Fa. Organon)
- Puffer : 20 mM Tris-HCl pH 7,4

Praktische Durchführung des Inkubationsansatzes

- Probe 1: 100 µl 125-J-SSM + 100 µl TDA⁺⁺⁺-IgG
Probe 2: 100 µl 125-J-SSM + 100 µl TDA⁺⁺⁺-IgG + 10 µl TSH
Probe 3: 100 µl 125-J-SSM + 100 µl TDA⁻-IgG
Probe 4: 100 µl 125-J-SSM + 100 µl TDA⁻-IgG + 10 µl TSH
Probe 5: 100 µl 125-J-SSM + 100 µl Probenpuffer

Die fünf Proben wurden 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Inkubation der 125-J-SSM mit TDA⁻-IgG und TDA⁻-IgG plus TSH dienten als Kontrolle, um unspezifisches Bandenmaterial zu erfassen. Die Inkubation mit TDA⁺⁺⁺-IgG plus TSH hatte den Zweck, die Verdrängung des positiven IgG's vom TSH-Rezeptor durch kaltes TSH zu veranschaulichen.

3.3.4. Chromatographie über Protein-A-Sepharose

Prinzip

Zur Ausfällung des 125-J-Antigen-Antikörper-Reaktionskomplexes wurde eine Affinitätschromatographie mit Protein-A-Sepharose CL-4B (Fa. Pharmacia, Schweden) durchgeführt.

Protein-A-Sepharose besteht aus Sepharose CL-4B, an die Protein A mit Bromcyan kovalent gebunden und die mit Dextran und Lactose gefriergetrocknet worden ist. 1 g davon entsprechen 3,5 ml gequollenem Gel, worin ca. 2 mg reines Protein A enthalten sind. Protein A wird aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus* isoliert (36, 55) und hat die Fähigkeit, das Fc-Fragment der Gamma-Immunglobuline spezifisch zu binden. Ein Molekül Protein A kann zwei Moleküle IgG binden (32, 42). Die Bindungskapazität des Protein A für Hu-IgG beträgt ca. 25 mg pro 1 ml gequollenem Sepharose-Gel.

Theoretisch würde man erwarten, daß - nach Inkubation der 125-J-markierten Schilddrüsenmembranen mit TDA⁺⁺⁺-IgG und anschließender Elution über Protein-A-Sepharose - dieses IgG zusammen mit dem 125-J-markierten TSH-Rezeptor am Protein A gebunden sein müßte. Für die Inkubationsansätze 2 - 5 dagegen würde man dies nicht erwarten. Siehe dazu auch Abbildung 14.

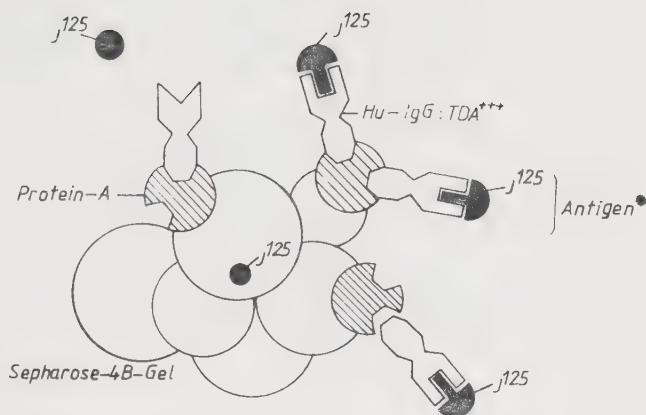


Abbildung 14: Prinzip der Affinitätschromatographie des ^{125}I -Antigen-Antikörper-Komplexes über Protein-A-Sepharose CL-4B Gel.

Praktische Durchführung

0,6 g Protein-A-Sepharose CL-4B wurden in 2,1 ml 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 etwa 15 min. gequollen. Zu jedem (unter 3.3.3. aufgeführten) Probenansatz wurden dann 300 μl gequollenes Gel hinzugegeben, so daß die IgG-Bindungs-kapazität des Gels deutlich über der angebotenen IgG-Men-ge lag. Die Proben wurden für 20 min. bei 4°C unter Drehen mit der Protein-A-Sepharose inkubiert. Anschlies-send wurde jeder Ansatz auf eine 2 ml Säule aufgetragen. Nach vollständiger Sedimentation des Gels wurde unspezi-fisches Probenmaterial solange mit 20 mM Trispuffer ausgewaschen, bis kaum noch Aktivität im Eluat nachweis-

bar war. Die Elution des spezifisch gebundenen Materials erfolgte mit 8 ml 2 %iger SDS-Lösung (in 20 mM Tris-HCl pH 7,4) in 1 ml Fraktionen. Die Aktivität der Fraktionen 1 - 8 wurden im Gamma-Counter gemessen und der Hauptaktivitätspeak (ca. 1.- 4.ml) gepoolt.

Der Aktivitätspeak wurde anschließend durch Trichloressigsäure (TCA)-Fällung konzentriert: Dazu wurden zu den 4 ml spezifischen Eluats 800 µl kalte 60 %ige TCA hinzugegeben und unter Rühren für 30 min. bei 4°C inkubiert. Die Probe wurde dann 15 min. bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit den konzentrierten Proben für die elektrophoretische Auftrennung aufbewahrt.

3.3.5. Elektrophorese und Autoradiographie

Material

- Probenpuffer: 0.125 M Tris-HCl mit 2 % SDS, 1 % Triton, 20 % Glycerin und 0,1 % Bromphenolblau, pH 7,4

Die mit TCA gefällten Pellets wurden je in 30 µl Probenpuffer und 10 µl 1.5 M Trispuffer - zum Neutralisieren der TCA - gelöst und auf ein PAA 4/20-Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte bei 200 V, 50 mA und 10°C für über 16 Stunden. Das Gel wurde anschließend fixiert, konserviert (vgl. 2.7.3.) und in Folie eingeschweißt auf den unter 3.1.2. beschriebenen Röntgenfilm gelegt, der für 8 Tage belichtet wurde. Anhand mitgelaufener Eichproteine, die gesondert vom radioaktiven Anteil des Gels fixiert und gefärbt worden waren, wurde den Belichtungsbanden des Röntgenfilms ihr jeweiliges Molekulargewicht zugeordnet.

3.4. Immunextraktion von spezifisch bindendem $^{125}\text{-J}$ -markiertem Antigenmaterial durch IgG-Affinitätschromatographie über Protein-A-Sepharose bei modifizierter radioaktiver Markierung (Methode IV)

Prinzip

Intakte Schilddrüsen-Follikelzellen wurden nach Blockade der Jodaufnahme durch Perchlorat mit $^{125}\text{-J}$ radioaktiv markiert. Ziel der Perchloratgabe war durch Hemmung des intrazellulären Jod-uptake's eine höhere Radiojodmarkierung speziell der Membranproteine an der Zelloberfläche zu erreichen. Zum Prinzip der Perchloratwirkung an der Schilddrüsenzellmembran siehe Abbildung 15.

Es folgten die Membranpräparation und Solubilisierung der $^{125}\text{-J}$ -markierten Schilddrüsenzellen und anschließend die Inkubation des gewonnenen radioaktiven Membranmaterials mit antikörperhaltigem Serum. Der spezifisch reagierende $^{125}\text{-J}$ -Antigen*Antikörper-Komplex wurde durch IgG-Affinitätschromatographie über Protein-A Sepharose eluiert. Abschließend folgte die Aktivitätsmessung des spezifisch eluierten Komplexes im Gamma-Counter.

Für den Inkubationsansatz wurden im Gegensatz zu Versuchsmethode III (3.3.) Patientenserum statt präpariertem Patienten-IgG benutzt. Außerdem wurde neben TDA-positivem Serum und TSH auch TGI-positives Serum und EGF verwendet.

EGF (epidermal-growth-factor) ist ein Faktor, der das Wachstum isolierter Schilddrüsenfollikelzellen stimuliert (20, 28). Man stellt sich vor, daß dieser wachstumsstimulierende Effekt des EGF's durch Interaktion des Peptids mit einem spezifischen Plasmamembranrezeptor ("Wachstums- oder EGF-Rezeptor") vermittelt wird.

Da der unter 2.6. beschriebene Versuch deutliche Hinweise dafür lieferte, daß "TGI" (Immunglobuline mit nachgewiesenen wachstumsstimulierender Wirkung auf die Schilddrüse) wahrscheinlich gar nicht gegen den TSH-Rezeptor gerichtet sind (Ergebnis siehe 4.3.), sollte in diesem Versuch überprüft werden, ob TGI möglicherweise Antikörper gegen den EGF-Rezeptor darstellen. Zur Erhärtung dieser These würde man folgendes erwarten:

- Bei Inkubation von ^{125}J -markierten Membranen mit TGI-positivem-Serum sollte das "TGI" an seinen radioaktiv markierten Rezeptor binden. Dieses spezifisch gebundene Membranantigen kann durch IgG-Affinitätschromatographie extrahiert werden.
- Falls nun der EGF-Rezeptor das korrelierende Antigen zu den thyroid-growth-stimulating immunoglobulins wäre, würde man nach Inkubation von ^{125}J -markierten Membranen mit TGI-positivem Serum und EGF-Zusatz erwarten, daß eine spezifische Verdrängung der "TGI" vom radioaktiven Wachstumsrezeptor durch EGF eintritt. Dies müßte sich nach Elution des "spezifischen" Antigenmaterials über Protein-A-Sepharose in einer Abnahme der Probenaktivität zeigen.
- Sollte "TGI" aber an den TSH-Rezeptor binden, dann müßte diese Bindung spezifisch durch TSH verdrängbar sein.

Nach Elektrophorese und Autoradiographie des spezifisch eluierten ^{125}J -Membranantigens müßte sich somit der TGI-Rezeptor vom Molekulargewicht her darstellen lassen. Wenn autoradiographisch diese Molekulargewichtsbande des TGI-Rezeptors spezifisch durch EGF verdrängbar wäre, würde dies die These bestätigen, daß "thyroid-growth-stimulating immunoglobulins" Antikörper sind, die gegen den EGF-Rezeptor gerichtet sind.

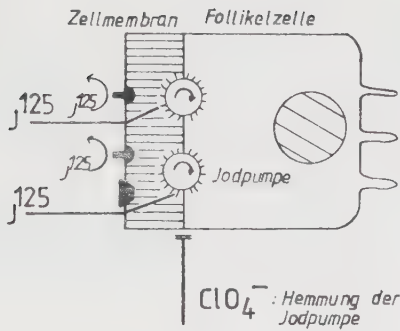


Abbildung 15: Modell der Perchloratreaktion an der Schilddrüse

3.4.1. Radioaktive Markierung porciner Follikelepithelzellen

Materialien

- Markierungsmedium (=MM): PBS + 10 mM $NaClO_4$
- Glucose: 200 mM in MM
- LPO: 20 U/ml in MM
- GOD: 10 U/ml in MM
- $Na J^{125}$: mit 2.22 μg J/ml und 11 - 17 mCi/ μg J
- 5 Schalen porcine Schilddrüsen-Follikelepithelzellen mit ca. 15×10^6 Zellen gesamt

Praktische Durchführung

Die Follikel epithelzellen, die sich in einer minimalen Nährlösung befanden, wurden einmal gegen das Markierungsmedium gewaschen. Nach Absetzen der Zellen auf den Grund wurde der flüssige Überstand vorsichtig abgehoben, die Zellen in 1,75 ml MM resuspendiert und für 15 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Die radioaktive Markierung erfolgte modifiziert nach einer Veröffentlichung von Chvatchko (11), in der die Jodierung von Insulinrezeptoren in Rattenleberzellen beschrieben ist.

Zu den 1,75 ml Follikelzellmaterial wurden 250 µl Glucose 250 µl LPO, sowie 20 µl Na J¹²⁵ ($\approx$ 0,5 mCi) hinzugegeben. Die Reaktion wurde mit 250 µl GOD gestartet und der Probenansatz für 60 min. bei 37°C unter Schütteln im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch 10minütiges Zentrifugieren bei 100 g und 4°C. Der Überstand mit Enzymmaterial und freiem 125-Jod wurde abgehoben und verworfen, das Pellet zum Waschen in 5 ml Markierungsmedium resuspendiert und erneut für 10 min. bei 100 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und das Pellet ein zweites Mal nachgewaschen.

3.4.2. Zytolose und Solubilisierung

Zytolose

Das Pellet wurde in 1200 µl Solubilisierungspuffer aufgenommen, der aus 1 % Triton-X, 1 mM PMSF und 0,1 mg/ml Trypsininhibitor gelöst in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 bestand und für 60 min. bei 4°C unter Drehen inkubiert. Nach 1 Stunde waren die Zellen mikroskopisch praktisch vollständig lysiert.

Solubilisierung

Die lysierten Follikelzellen wurden für 60 min. bei 100000 g und 4°C in der Beckman-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand mit den solubilisierten 125-J-markierten Schweine-SD-Membranen wurde vorsichtig abgehoben und im Gamma-Counter gezählt. Die Aktivität der solubilisierten 125-J-SSM betrug zwischen $1,5 - 2,0 \times 10^6$ cpm/100 μ l, was einem Jodeinbau von 0,15 - 0,2 % entsprach. Zur weiteren Verwendung wurden die solubilisierten 125-J-SSM mit 10 mM Tris -HCl pH 7,4 auf ca. 700 000 cpm/100 μ l verdünnt.

3.4.3. Inkubationsansatz

Material

- 125-J-SSM mit 700 000 cpm/100 μ l
- Humane Seren:
 - TDA⁺⁺⁺-Serum, Serumnummer B 1*
 - TGI⁺⁺⁺-Serum, Serumnummer A 1*
 - TGI⁺⁺⁺-Serum, Serumnummer B 3*
 - TDA⁻ -Serum, Kontrollserum
- *) nähere Angaben zu diesen Seren siehe unter 4.3.
- Hormone:
 - bov. TSH (200 mU/ml in H₂O), Fa. Organon
 - EGF (200 ng/ml in H₂O), Fa. Sigma
 - EGF = epidermal-growth-factor
- Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,4

Praktische Durchführung des Inkubationsansatzes

50 μ l Serum (A1/B1/B3/Kontrollserum)
+ 40 μ l Puffer
+100 μ l 125-J-SSM

1 Std. bei 37°C im Wasserbad inkubieren

+ Hormonzugabe: a) 10 μ l Puffer
b) 10 μ l TSH
c) 10 μ l EGF

Weitere Inkubation für 3 Std. bei 4°C

Die Endkonzentration an TSH pro Inkubationsansatz betrug somit 10 mU/ml, an EGF 10 ng/ml. Alle Proben wurden in Doppelwerten angesetzt.

3.4.4. Chromatographie über Protein-A-Sepharose

Die Proben des Inkubationsansatzes 3.4.3. wurden auf 2 ml Säulen aufgetragen, die mit 300 µl Protein-A-Sepharose-Gel aufgefüllt waren und für 20 min. inkubiert. Nach Inkubation wurde unspezifisches Membranmaterial mit 10 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 ausgewaschen und anschließend mit 3 ml 100 mM Glycin pH 3,0 spezifisch eluiert.

3.4.5. Aktivitätsmessung der spezifisch eluierten Proben

Die Aktivität des spezifischen Eluats wurde in 500 µl Aliquots (bei 3 ml Gesamtmenge) im Gamma-Counter in counts per minute bestimmt, um so festzustellen, ob durch TSH- bzw. EGF-Zusatz eine Abnahme der Probenaktivität und damit eine spezifische Verdrängung eintritt.

Eine weitere Abklärung der Proben wie in Versuchsmethode III (3.3.), d.h. die elektrophoretische Auftrennung und Autoradiographie des spezifisch eluierten Materials, wurde nicht durchgeführt, da die gewonnene Aktivität des Probenmaterials so gering war, daß sie für eine autoradiographische Darstellung auf Röntgenfilm nicht ausreichte.

4. ERGEBNISSE

4.1. Effizienz verschiedener Detergentien bei der Membran-solubilisierung (Methode: 2.1.2.)

Die solubilisierten Schweinemembranen wurden zusammen mit hochmolekularen Referenzproteinen (= ref.) bestehend aus Thyreoglobulin (669 000 Dalton Molekulargewicht), Ferritin (440 000 D), Catalase (232 000 D), Lactat-Dehydrogenase (140 000 D) und Albumin (67 000 D) auf Polyacrylamid-Gradientengelen elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe der Referenzproteine wurde eine Eichkurve erstellt, an der das Molekulargewicht der einzelnen Schilddrüsen-Membranbanden abgelesen werden konnte. Die Eichkurve erhielt man, indem man das Molekulargewicht jedes Eichproteins seinem relativen Mobilitätsfaktor (= Rf) gegenüberstellte.

4.1.1. SDS (siehe Abbildung 16)

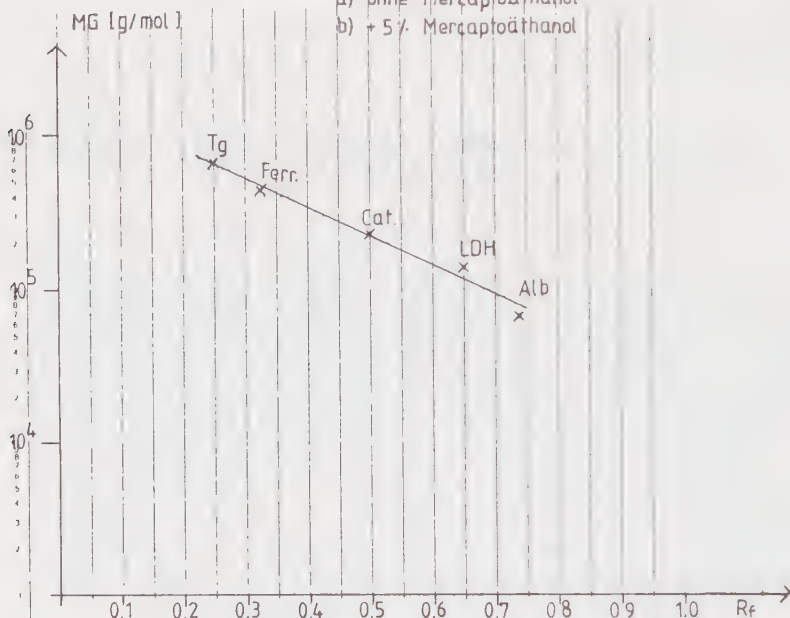
Die elektrophoretische Auftrennung der in 1 % SDS solubilisierten Schweineschilddrüsen-Membranen zeigte nach Coomassie Blue Färbung 6 Proteinbanden bei 670 000, 230 000, 190 000, 160 000, 140 000 und 100 000 Dalton Molekulargewicht.

Die Solubilisierung der Membranen mit 1 % SDS und 5 % Mercaptoäthanol ergab zu diesen 6 Banden eine weitere Proteinbande bei 440 000 Dalton.

Probe: SSM in 1% SDS solub.

a) ohne Mercaptoäthanol

b) + 5% Mercaptoäthanol



Probe a)

SSM [cm]	~	MG
B 1 (2,0)	~	670 000
B 2 (4,0)	~	230 000
B 3 (4,3)	~	190 000
B 4 (4,7)	~	160 000
B 5 (5,0)	~	140 000
B 6 (5,5)	~	100 000

Probe b)

B 1 (2,0)	~	670 000
B 2 (2,6)	~	440 000
B 3 (4,0)	~	230 000
B 4 (4,3)	~	190 000
B 5 (4,7)	~	160 000
B 6 (5,0)	~	140 000
B 7 (5,5)	~	100 000

Abbildung 16:

Elektrophoretische Auftrennung von Schweine-SD-Membranen solubilisiert in 1 % SDS und dazugehörige Eichkurve der Referenzproteine

unten:

PAA 4/30 Gel; Laufbedingungen: 125 V, 50 mA, 10°C, 15 Std.

Probe a):

SSM solub. in 1 % SDS

Probe b):

SSM solub. in 1 % SDS

+ 5 % β -Mercaptoäthanol

ref = Referenzproteine bestehend von oben nach unten aus:

Tg (669000), Ferr. (440000),

Cat. (232000)

LDH (140000), Alb. (67000).

Mitte:

Molekulargewicht der einzelnen Schilddrüsenmembranbanden (B₁ bis B₆) an der Eichkurve abgelesen.

oben:

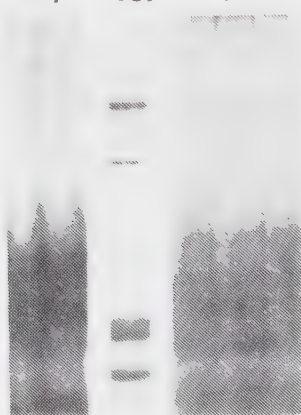
Eichkurve; Koordinate:

Molekulargewicht,

Abszisse: relat.

Mobilitätsfaktor (R)

a) ref b)



4.1.2. Zwittergent

Die Elektrophorese der Schweine-Schilddrüsenmembranen in 10 mM Zwittergent zeigte nach Färbung des Gels insgesamt 8 Proteinbanden bei 669000, 145000, 120000, 95000, 85000, 75000, 67000 und 60000 Dalton Molekulargewicht (Siehe Abbildung 17).

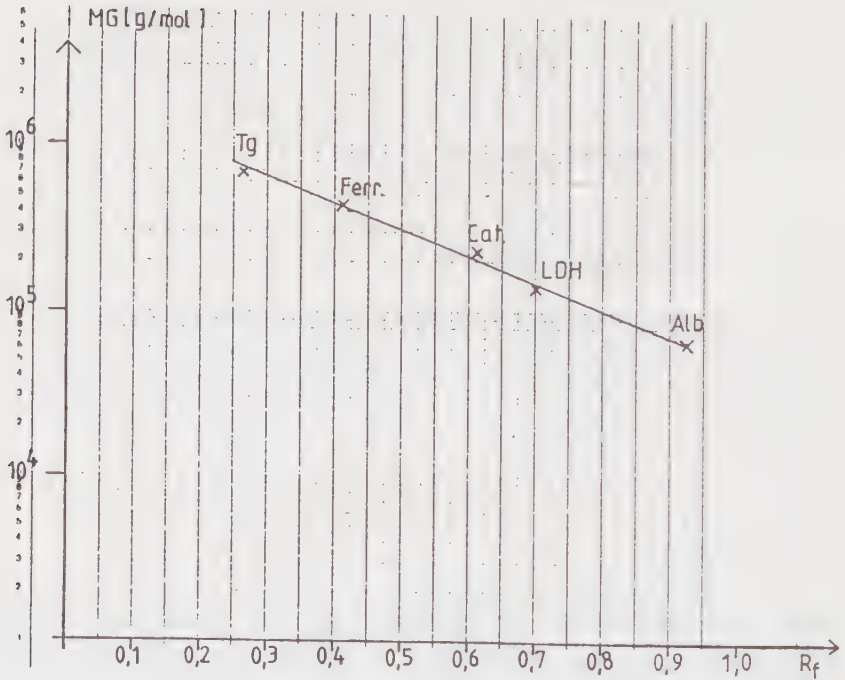
4.1.3. Zwittergent und Triton

Die Elektrophorese der in 10 mM Zwittergent und 0,2 % Triton-X solubilisierten Schilddrüsenmembranen zeigte ebenfalls 8 Proteinbanden mit 670000, 180000, 145000, 90000, 75000, 67000, 60000 und ca. 55000 Dalton Molekulargewicht (Siehe Abbildung 18).

4.1.4. Triton

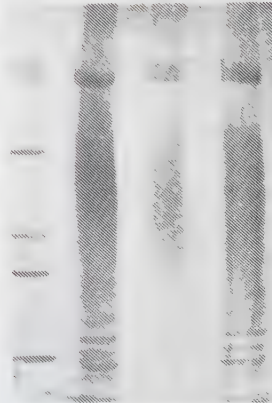
Nach Solubilisierung der Membranen in 1 % Triton-X ergaben sich 12 scharf abgrenzbare Proteinbanden bei 669000, 450000, 430000, 340000, 280000, 180000, 140000, 125000, 90000, 80000, 67000 und ca. 60000 Dalton Molekulargewicht. Im Molekulargewichtsbereich kleiner 60000 Dalton zeigten sich 4 weitere - allerdings nur schwach abgrenzbare - Membranbanden (Siehe Abbildung 19).

Probe: SSM in 10mM-Zwittergent solub.



SSM[dm]	~	MG
B. 1 (2,0)	~	669 000
B. 2 (5,5)	~	145 000
B. 3 (6,0)	~	120 000
B. 4 (6,5)	~	95 000
B. 5 (6,8)	~	85 000
B. 6 (7,1)	~	75 000
B. 7 (7,4)	~	67 000
B. 8 (7,6)	~	60 000

ref ssm



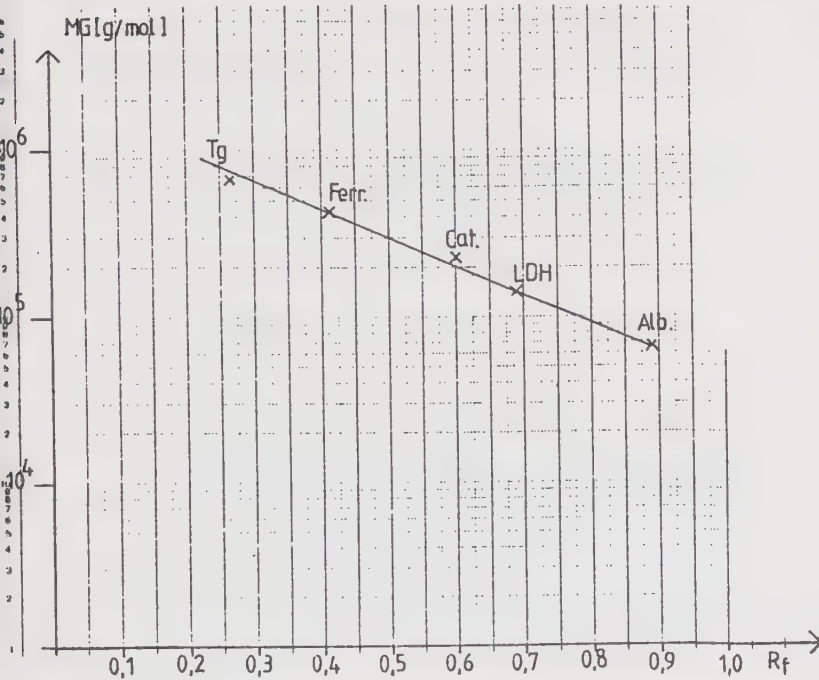
unten rechts:
PAA 4/30 Gel;
Laufbedingungen:
125 V, 50 mA, 10°C, 15 Std
Probe = SSM:
in 10mM-Zwittergent
solub. Membranen
ref = Referenzproteine:
Tg, Ferr., Cat, LDH, Alb.
von oben nach unten

unten links:
Molekulargewicht der ein-
zelnen Schilddrüsenmem-
branbanden

oben:
Eichkurve

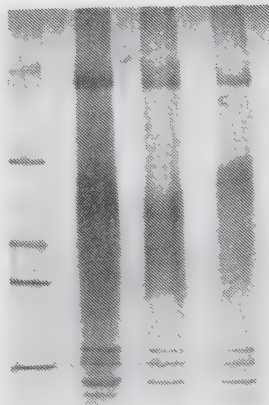
Abbildung 17: Elektrophorese von Schweine-SD-Membranen solubilisiert in 10 mM-Zwittergent und dazugehörige Eichkurve der Referenzproteine

Probe : SSM in 10mM-Zwittergent u. 0,2 % Triton solub.



SSM [cm]	~	MG
B 1 (1,8)	~	670 000
B 2 (5,1)	~	180 000
B 3 (5,5)	~	145 000
B 4 (6,5)	~	90 000
B 5 (6,8)	~	75 000
B 6 (7,0)	~	67 000
B 7 (7,4)	~	60 000
B 8 (7,6)	~	55 000

ref ssm



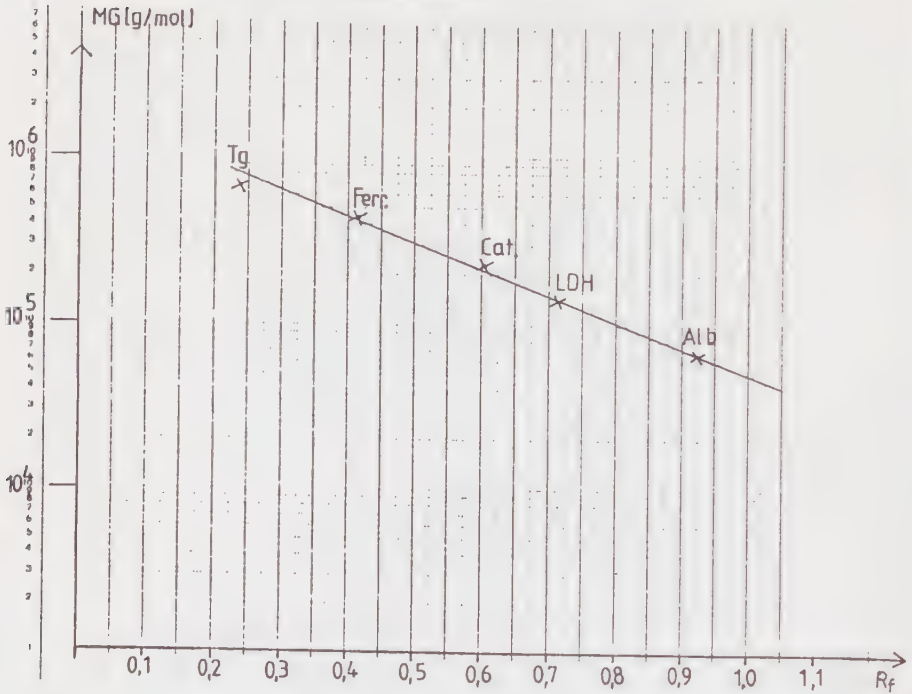
unten rechts:
 PAA 4/30 Gel;
 Laufbedingungen: 125 V.
 50 mA, 10°C, 15 Std.
 Probe = SSM:
 in 10 mM-Zwittergent
 + 0,2 % Triton
 solub. Membranen
 ref. = Referenzproteine:
 Tg, Ferr., Cat.,
 LDH, Alb. von oben
 nach unten

unten links:
 Molekulargewicht der
 einzelnen Schilddrüsen-
 membranbanden

oben:
 Eichkurve

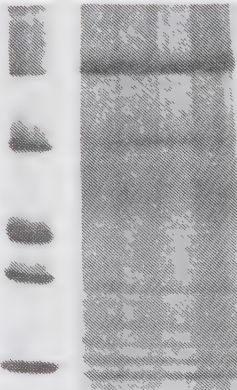
Abbildung 18: Elektrophorese von Schweine-SD-Membranen soubilisiert in 10 mM-Zwittergent und 0,2 % Triton mit der dazugehörigen Eichkurve der Referenzproteine

Probe: SSM in 1,0 % Triton (Proteinkonz. ~150 mg/ml)



SSM [cm]	~	MG
B 1 (1,9)	~	669 000
B 2 (3,1)	~	450 000
B 3 (3,3)	~	430 000
B 4 (3,8)	~	340 000
B 5 (4,2)	~	280 000
B 6 (5,2)	~	180 000
B 7 (5,7)	~	140 000
B 8 (6,0)	~	125 000
B 9 (6,7)	~	90 000
B 10 (7,0)	~	80 000
B 11 (7,4)	~	67 000
B 12 (7,6)	~	60 000
evtl. Banden darunter:		
B 13 (7,7)	~	55 000
B 14 (8,0)	~	50 000
B 15 (8,2)	~	45 000
B 16 (8,5)	~	40 000

ref ssm



unten rechts:
PAA 4/30 Gel; Laufbedingungen:
125 V, 50 mA, 10°C, 15 Std.
Probe = SSM: in 1 % Triton
solub. Membranen

ref = Referenzproteine:
Tg, Ferr., Cat., LDH, Alb.
von oben nach unten

unten links:
Molekulargewicht der einzel-
nen Schilddrüsenmembranbanden

oben:
Eichkurve

Abbildung 19: Elektrophorese von Schweine-SD-Membranen solubilisiert in 1 % Triton-X-100 und dazugehörige Eichkurve der Referenzproteine

Die Verwendung von 1% Triton-X als lipophiles Detergens ergab gemessen an der Zahl der Banden die höchste Ausbeute an Membranproteinen. Insbesondere im Molekulargewichtsbereich zwischen 670000 und 150000 Dalton wurden Proteinbanden sichtbar, die bei Verwendung des biionischen Zwittergents nicht darstellbar gewesen sind. SDS als ionisches Detergens ergab praktisch keine saubere Auftrennung des Membranmaterials.

4.2. Optimierung des TDA-Assay

4.2.1. Einflußparameter der Bindung zwischen bovinem 125-J-TSH und porcinen Membranen im TDA (Methode: 2.2.3.)

Folgende Parameter wurden im TDA überprüft:

- Konzentration an Enzyminhibitoren im Homogenisierungspuffer
- Proteinkonzentration
- Stabilität
und
- Gefriertrocknen

von Schweine-SD-Membranen, die in 1 % Triton-X solubilisiert waren.

Verglichen wurden tabellarisch für jeden Rezeptorassay die spezifische Bindung (sp.B.), die sich aus:

$$(B_o - N) \times T^{-1} \times 100 \%$$

ergab, die unspezifische Bindung (N), der 50 %-Intercept (50 %-IC) in der Einheit mE TSH/ml und die untere Nachweisgrenze (u. Ng.) in mE TSH/ml als Maß der Empfindlichkeit.

Konzentration an Enzyminhibitoren im Homogenisierungspuffer (siehe Tabelle 1)

Bei Verwendung des Homogenisierungspuffers A (10 mM Tris, 50 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 20 mM β -Mercaptoäthanol und 100 mg/ml Trypsininhibitor, pH 7,4) ergab sich eine spezifische Bindung der solubilisierten Schweinemembranen (mit 3 mg/ml Proteinkonzentration) von 5,4 %, bei einer unspezifischen Bindung von 1,0 % und einer unteren Nachweisgrenze von 0,12 mE TSH/ml. Der 50 %-Intercept betrug 0,3 mE TSH/ml. Bei Verwendung des Homogenisierungspuffers B (10 mM Tris, 5 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 2 mM β -Mercaptoäthanol und 100 mg/ml Trypsininhibitor, pH 7,4) war die spezifische Bindung der solubilisierten Schweinemembranen (3 mg/ml Proteinkonzentration) 3,8 %, die unspezifische Bindung 1,1 %, die untere Nachweisgrenze 0,18 mE TSH/ml und der 50 %-Intercept 0,27 mE TSH/ml.

D.h. die Bindung des bovinen TSH-Tracers an die solubilisierten Schweinemembranen war abhängig von der Konzentration der - zu Beginn der Präparation - verwendeten Enzyminhibitoren. Eine gezielte Austestung weiterer Enzyminhibitoren in Abhängigkeit von der Konzentration ließe sicherlich noch eine Steigerung der spezifischen Bindung erwarten.

Tabelle 1: Einfluß der Konzentration an Enzyminhibitoren im Homogenisierungspuffer auf das Bindungsverhalten solub. Schweineschilddrüsenmembranen im TDA: Vergleich der spezif. Bindung, der unspezif. Bindung (N), des 50 %-IC und der unteren Nachweisgrenze bei Verwendung des Homogenisierungspuffers A und des Homogenisierungspuffers B zur Membranpräparation

Probe	sp.B. (%)	N (%)	50%-IC (mE TSH/ml)	u. Ng. (mE TSH/ml)
a)				
SSM 1x: 3 mg/ml	5,4	1,0	0,30	0,12
Homogen.-puffer A				
b)				
SSM 1x: 3 mg/ml	3,8	1,1	0,27	0,18
Homogen.-puffer B				

Proteinkonzentration (siehe Tabelle 2)

Überprüft wurden im TDA-Assay in Triton solubilisierete Schweinemembranen mit 3 mg/ml, 7,5 mg/ml und 15 mg/ml Proteinkonzentration. Bei 3 mg/ml Proteinkonzentration betrug die spezifische Bindung: 5,4 %, N: 1,0 %, der 50 %-IC: 0,3 mE TSH/ml und die untere Nachweisgrenze: 0,12 mE TSH/ml. Bei einer Proteinkonzentration von 7,5 mg/ml war die spezif. Bindung: 17,0 %, N: 2,5 %, der 50 %-IC: 0,69 mE TSH/ml und die untere Ng.: 0,1 mE TSH/ml. Bei 15 mg/ml Membrankonzentration betrug die spezifische Bindung: 23,8 %, N: 3,0 %, der 50 %-IC: 4,249 mE TSH/ml und die untere Ng.: 0,154 mE TSH/ml.

Das heißt, mit steigender Proteinkonzentration stieg auch die spezifische Bindung, wobei bei einer Proteinkonzentration von 15 mg/ml eine maximale spezifische Bindung von ca. 21 % $\pm$ 3 % erreicht wurde.

Für die durchgeführten Blottingversuche sind Schweinemembranen mit 15 mg/ml bei einer spezifischen Bindung von ca. 21 % verwendet worden.

Tabelle 2: Einfluß der Proteinkonzentration solub. SSM im TDA. Membranen: Schweinemembranen solub. in 1 % Triton mit a) 3 mg/ml b) 7,5 mg/ml und c) 15 mg/ml Protein.
sp. B: spezifische Bindung;
N: unspezifische Bindung
50%-IC: 50 %-Intercept
u. Ng.: untere Nachweisgrenze

Probe	sp.B. (%)	N (%)	50%-IC (mE TSH/ml)	u. Ng. (mE TSH/ml)
a) SSM 1,0x; 3,0 mg/ml:	5,4	1,0	0,300	0,120
b) SSM 2,5x; 7,5 mg/ml:	17,0	2,5	0,690	0,100
c) SSM 5,0x; 15,0 mg/ml:	23,8	3,0	4,249	0,154

Stabilität solubilisierter Schweinemembranen

(siehe Tabelle 3)

Verwendet wurden jeweils solubilisierete Schweinemembranen mit 3 mg/ml Protein. Die Membranen wurden im Radiorezeptorassay a) in frisch solub. Zustand, b) 24 Std. bei 4°C nach Solubilisieren, c) 48 Std. bei 4°C nach Solubilisieren und d) 24 Std. bei Raumtemperatur nach Solubilisieren überprüft. Ergebnisse siehe Tabelle 3.

Tabelle 3: Überprüfung der Stabilität solubilisierter Schweinemembranen von 3 mg/ml Protein im TDA:
 sp. B.: spezifische Bindung
 N: unspezifische Bindung
 50%-IC: 50 %-Intercept
 u. Ng.: untere Nachweisgrenze.
 Membranen solub. in 1 % Triton

Probe	sp. B. (%)	N (%)	50 %-IC (mE TSH/ml)	u. Ng. (mE TSH/ml)
a) SSM (3 mg/ml): frisch	5,2	1,1	0,27	0,160
b) SSM (3 mg/ml): 24 h, 4°C	4,9	1,2	2,90	1,500
c) SSM (3 mg/ml): 48 h, 4°C	3,9	1,0	0,38	0,119
d) SSM (3 mg/ml): 24 h, RT	3,8	1,5	1,64	0,194

Die Bindungsfähigkeit des bovinen TSH-Tracers an die solubilisierten Membranen nahm mit zunehmendem Alter und steigender Umgebungstemperatur ab. Während Membranen, die nach dem Solubilisieren 24 Stunden bei 4°C aufbewahrt worden sind, mit einer spezifischen Bindung von 4,9 % relativ stabil waren - gegenüber einer spezifischen Bindung von 5,2 % in frisch solubilisiertem Zustand - nahm

die spezifische Bindung bei Membranen, die nach dem Solubilisieren über den gleichen Zeitraum bei Raumtemperatur aufbewahrt worden sind, auf 3,8 % ab.

Lyophilisieren solubilisierter Schweinemembranen

(siehe Tabelle 4)

Verglichen wurden a) frisch solubilisierter Schweinemembranen von 3 mg/ml Proteinkonzentration mit b) solubilierten Membranen von 3 mg/ml Protein, die nach dem Solubilisieren lyophilisiert und im gefriergetrockneten Zustand für 1 Woche bei -20°C aufbewahrt worden waren. Ergebnisse siehe Tabelle 4.

Tabelle 4: Einfluß des Lyophilisierens von solubilisierten Membranen auf das Bindungsverhalten von bovinem TSH-Tracer an solubilisierter Schweinemembranen im TDA.

sp. B.: spezifische Bindung

N: unspezifische Bindung

50%-IC: 50 %-Intercept.

u. Ng.: untere Nachweisgrenze

Probe	sp.B. (%)	N (%)	50 %-IC (mE TSH/ml)	u.Ng. (mE TSH/ml)
a)				
SSM (3 mg/ml): frisch	5,3	1,0	0,28	0,120
b)				
SSM (3 mg/ml): lyophil.	5,2	0,6	0,38	0,121

Das Lyophilisieren von solubilisierter Membranen hatte praktisch keine Abnahme der spezifischen Bindung zur Folge, so daß es ein geeignetes Verfahren zur Lagerung und Konzentrierung der solubilisierter Membranen darstellte.

4.2.2. Vergleich der Bindung von bovinem 125-J-TSH an porcine und humane Membranen (Methode: 2.2.4.)

Verwendet wurden humane und Schweinemembranen solubili-
siert in 1 % Triton mit a) 6 mg/ml und b) 15 mg/ml
Proteinkonzentration. Die Bindung des bovinen TSH-Tracers
an die humanen bzw. porcinen Membranen wurde vergleichend
im TDA überprüft. Das Ergebnis hierzu zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5: Vergleich der Bindung von 125-J-TSH an porcine
(= SSM) und humane Schilddrüsenmembranen (= Hu-SM) ausgehend von gleichen Proteinkonzentrationen.
sp.B.: spezifische Bindung
N: unspezifische Bindung
50%-IC: 50 %-Intercept
u.Ng.: untere Nachweisgrenze

Probe	sp. B. (%)	N (%)	50 %-IC (mE TSH/ml)	u. Ng. (mE TSH/ml)
a)				
SSM : 6 mg/ml	10,12	2,1	3,320	0,214
Hu-SM: 6 mg/ml	7,85	1,4	17,300	0,667
b)				
SSM : 15 mg/ml	21,0	1,1	1,495	0,159
Hu-SM: 15 mg/ml	18,6	1,4	2,470	2,390

Ein Vergleich der Bindung von bov. TSH-Tracer an porcine bzw. humane Membranen zeigte, daß das 125-J-TSH eine höhere Bindungsaffinität für die Schweinemembranen besaß. Bei gleicher Proteinkonzentration humaner und porciner Schilddrüsenmembranen lag die spezifische Bindung der Schweinemembranen sowohl bei 6 mg/ml als auch bei 15 mg/ml Protein über der der humanen Membranen. Der 50 %-Intercept und die untere Nachweisgrenze hatten im

im porcinen System einen niedrigeren Wert und zeigten damit eine höhere Empfindlichkeit der Schweineschilddrüsenmembranen im TDA an. Abbildung 20 stellt vergleichend die TDA-Standardkurven porciner und humaner Membranen mit 15 mg/ml Proteinkonzentration gegenüber.

Die geringere Empfindlichkeit humaner Membranen im TDA läßt sich eventuell dadurch erklären, daß das verwendete Schilddrüsengewebe aus Strumaresektionsmaterial stammte und damit gegenüber normalem Gewebe einen höheren Bindegewebsanteil aufwies.

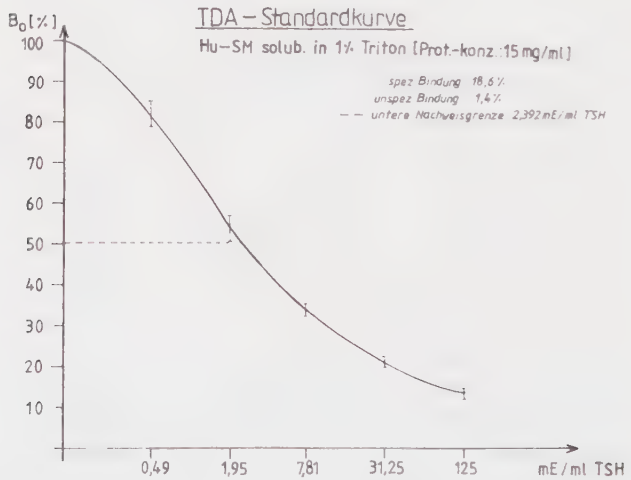
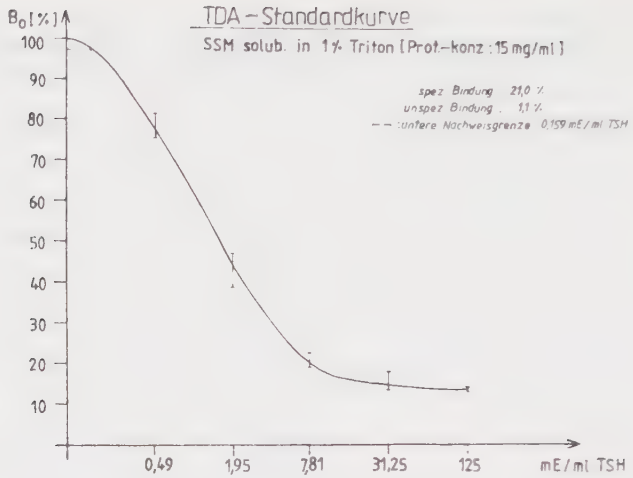


Abbildung 20: Vergleich der TDA-Standardkurven von Schweine-(= SSM) und humanen Schilddrüsenmembranen (= Hu-SM) mit 15 mg/ml Proteinkonzentration. (Bindungswerte siehe Tab. 5b)

4.2.3. Verdrängung von bovinem 125-J-TSH durch Patientenserum im porcinen und humanen System (Methode:2.2.5.)

Solubilisierete porcine und humane Schilddrüsenmembranen wurden so im TDA-Assay eingesetzt, daß die spezifische Bindung des TSH-Tracers an die Membranen in beiden Fällen ca. 11 % betrug. Die Werte der Eichkurven waren im Einzelnen für die

- a) porcinen Membranen: sp. B.: 11,17 %; N: 3,9 %;
50 %-IC: 0,296 mE TSH/ml;
u. Ng.: 0,152 mE TSH/ml
- b) humanen Membranen: sp. B.: 11,12 %; N: 3,21 %
50 %-IC: 2,074 mE TSH/ml;
u. Ng.; 0,271 mE TSH/ml.

Zur Überprüfung auf TSH-Rezeptor-Antikörper sind 11 Patientenserum der endokrinologischen Abteilung der Medizin. Klinik München ausgewählt worden, wobei drei Krankheitsgruppen vertreten waren:

Gruppe A: Patienten mit nicht-immunogen bedingten SD-Erkrankungen und rezidivierenden Strumen

Gruppe B: Patienten mit immunogenen SD-Erkrankungen bei gleichzeitiger Rezidivstruma

Gruppe C: Patienten mit autonomem Adenom und Hyperthyreose.

Die Verdrängung des TSH-Tracers vom TSH-Rezeptor durch das Patientenserum wurde angegeben in prozentual verbliebener 125-J-TSH Bindung, wobei die Gesamtbindung (Bo) mit 100 % gleichgesetzt wurde. Werte unter 80 % galten als eindeutig TDA-positiver Befund. Näheres zur Auswertung des TDA siehe unter 2.2.5..

Das Ergebnis der TDA-Auswertung - vergleichend durchgeführt mit porcinen und humanen Membranen - ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: TSH-verdrängende Aktivität von Patientenserum im TDA bei Verwendung solubilisierter Schweinemenbranen (= SSM) und solubilisierter humaner Membranen (= Hu-SM): TSH-Verdrängung gemessen in %, wobei $B_0 = 100\%$. Spezif. Bindung des TSH-Tracers in beiden Fällen 11 %.
e.O. = endokrine Ophthalmopathie

Nummer des Patienten- serums	Diagnose	TDA (%) bei SSM	TDA (%) bei Hu-SM
A a	rezidiv. Struma nodosa	110,2	103,3
A b	rezidiv. Struma	89,3	105,8
A c	rezidiv. Struma	103,7	97,4
A d	rezidiv. Struma	104,8	109,5
B a	M. Basedow u. e.O.	70,9	88,6
B b	M. Basedow u. e.O.	70,6	76,0
B c	M. Basedow, Ø e.O.	24,6	3,1
B d	M. Basedow, Hypothyreose	78,5	79,2
B e	M. Basedow u. e.O.	43,6	70,1
C a	autonomes Adenom u. Hyperthyreose	88,9	94,8
C b	autonomes Adenom u. Hyperthyreose	102,7	103,9

Die Verdrängung von TSH durch Patientenserum war bei Verwendung von Schweine- und humanen Membranen vergleichbar: In 8 von 11 Fällen war im porcinen System sogar eine stärkere Verdrängung zu verzeichnen, was auf eine höhere Empfindlichkeit der Schweinemenbranen für humane TSH-Rezeptor-Ak hinweist. Die Verwendung dieses heterologen Systems - von porcinen Membranen und humanem IgG im TDA - ist damit durchaus gerechtfertigt.

Patientenserum der Gruppe A (= nicht-immunogen bedingte SD-Erkrankungen) und C (= autonomes Adenom) zeigten, wie

erwartet, keinen TDA-positiven Befund. Die Gruppe B der Patientenseren (= immunogen bedingte SD-Erkrankungen) war bis auf Probe B a sowohl im porcinen als auch im humanen System eindeutig TDA-positiv. Das Serum B a dagegen zeigte nur im porcinen System einen eindeutig positiven Befund, während bei Verwendung humaner Membranen kein Hinweis auf TSH-Rezeptor-Antikörper vorlag.

4.3. Charakterisierung des IgG's von sechs Patientenseren im TDA-, TGI- und TSI-Assay (Methode: 2.6.)

Ziel der Untersuchung war die Abklärung der Frage, ob TGI-positives IgG wirklich an den TSH-Rezeptor bindet, und somit das Wachstum der Schilddrüse über den TSH-Rezeptor vermittelt wird.

Hierzu wurden sechs Patientenseren der endokrinologischen Abteilung der Medizinischen Klinik München ausgewählt, von denen zwei Seren der Krankheitsgruppe A entstammten (nicht-immunogen bedingte Schilddrüsenerkrankungen mit rezidivierenden Strumen). Die übrigen vier Seren stammten von Patienten mit immunogenen Schilddrüsenerkrankungen bei gleichzeitiger Rezidivstruma (Krankheitsgruppe B). Diese Seren wurden auf ihre Antikörperfunktion im TDA-, TGI- und TSI-Assay untersucht.

Zur methodischen Durchführung des TDA-, TGI- und TSI-Assay und deren Auswertung siehe 2.2., 2.3. und 2.4..

Das Ergebnis der Untersuchung zeigt Tabelle 7.

Tabelle 7: Funktionsprüfung von Patientenserum im TDA-, TGI- und TSI-Assay

A: Patienten mit nicht immunogenen SD-Erkrankungen bei rezidiv. Struma

B: Patienten mit immunogenen SD-Erkrankungen bei rezidiv. Struma

e.O.: endokrine Ophthalmopathie

Nr. des Patienten- serums	Diagnose	Behandlg.	TgAk	MAK	TDA quant. qual. a) 2 mg/ml b) qual. (%)	TGI: %-Wachstum IgG-Stimul.	TSI qual.
A 1	rezidiv. Struma nodosa	T ₃ /T ₄	Ø	+	84,6	690	+++
A 2	rezidiv. Struma	T ₃ /T ₄	Ø	Ø	91,6	613	+++
B 1	rezidiv. M. Basedow u. e.O.	Ø	+	+	34,1	99	++
B 2	rezidiv. immunog. Hyperthyreose u. e.O.	T ₃ /T ₄	Ø	Ø	87,0	90	-
B 3	rezidiv. immunog. Hyperthyreose	Ø	Ø	Ø	93,9	733	+++
B 4	rezidiv. immunog. Hyperthyreose u. e.O.	Ø	Ø	+	96,9	761	+++

Die Proben A 1, A 2, B 3 und B 4 bewirkten im TGI-Assay ein starkes Wachstum der Schweine-SD-Follikelzellen, waren aber im TDA-Assay eindeutig negativ, d.h. es konnten keine Antikörper gegen den porcinen TSH-Rezeptor gemessen werden.

Die Probe B 1 dagegen hatte TSH-Rezeptor-Antikörper (TDA^{+++}) mit schilddrüsenstimulierender Funktion (TSI^{++} : 2-fach-positive cAMP-Freisetzung), besaß aber keine Antikörper, die das Wachstum der Schilddrüsenfollikelzellen stimulierten (TGI^-).

Die Probe B 2 zeigte weder TSH-Rezeptor-Ak (TDA^-) noch einen wachstumsstimulierenden Effekt auf die Schilddrüse (TGI^-).

4.4. Ergebnis der Autoradiographie von Versuchsmethode I: TSH-Rezeptor Nachweis durch elektrophoretische Auftren- nung eines Präinkubats von $^{125}\text{-J-TSH}$, solubil. Schilddrüsenmembranen und Human-IgG (Methode: 3.1.)

Die Versuchsmethode I sollte eine sichere Molekulargewichtsdarstellung des porcinen TSH-Rezeptors erbringen.

Bovines $^{125}\text{-J-TSH}$ mit ca. 180000 cpm/100 μl ist in verschiedenen Inkubationsansätzen mit solubilisierten Schweine-SD-Membranen, sowie mit TDA^{+++} - und TDA^- -IgG inkubiert worden. Die Probenansätze sind anschließend elektrophoretisch auf einem PAA 4/20-Gel aufgetrennt und die Auftrennung autoradiographisch dargestellt worden (siehe 3.1.2.).

Das Ergebnis der Autoradiographie zeigt Abbildung 21.

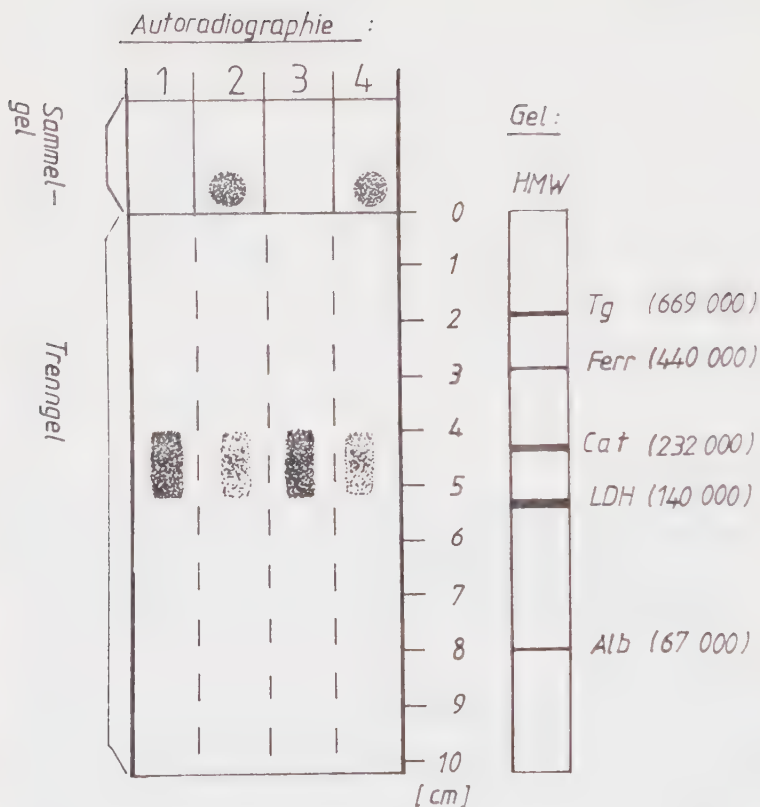


Abbildung 21: Ergebnis der Autoradiographie der Versuchsmethode I

Links: Autoradiographie auf Kodak Ortho-H Röntgenfilm nach 14 Tagen Belichtung
 Pos. 1: bov. 125-J-TSH
 Pos. 2: bov. 125-J-TSH + SSM
 Pos. 3: bov. 125-J-TSH + SSM + TDA⁺⁺⁺-IgG
 Pos. 4: bov. 125-J-TSH + SSM + TDA⁻-IgG

Rechts: PAA 4/20 Gel mit HMW-Eichproteinen
 Probenlauf bei: 200 V, 50 mA, 10°C, 19 Std.

Der bovine TSH-Tracer auf Position 1 zeigte nach elektrophoretischer Auftrennung und Autoradiographie ein Molekulargewicht von 150000 - 280000 D statt - wie erwartet - ca. 30000 Dalton.

Der TSH-Tracer * TSH-Rezeptor-Komplex (Position 2) hatte sich nicht auftrennen lassen, sondern blieb im Sammelgel liegen. Im Bereich zwischen 4,0 - 5,0 cm des Trenngels wurde überschüssiges 125-J-TSH sichtbar.

Position 3 zeigte den TSH-Tracer * TSH-Rezeptor-Komplex nach Inkubation mit TDA^{+++} -IgG. Auf dem Röntgenfilm war **keine** Ansammlung von bovinem 125-J-TSH im Sammelgel zu sehen, sondern nur die TSH-Tracerbande bei 150000 - 240000 D (= 4,0 - 5,0 cm). Daraus läßt sich ableiten, daß das radioaktive TSH in diesem Falle keine Bindung mit dem TSH-Rezeptor eingegangen ist, da die Bindungsstellen bereits durch TDA^{+++} -IgG besetzt waren.

Der Inkubationsansatz mit TSH-Tracer, TSH-Rezeptor und TDA^- -IgG (Pos. 4) dagegen zeigte sowohl die Ablagerung im Sammelgel, als auch die Bande mit überschüssigem TSH bei 150000 - 240000 D: Das heißt, in diesem Falle konnte der bovine TSH-Tracer mit dem Rezeptor reagieren, da er durch TDA^- -IgG nicht von den Bindungsstellen des TSH-Rezeptors verdrängt wurde.

Die Vermutung, daß das erhöhte Molekulargewicht des bov. TSH-Tracers durch eine Aggregation der radioaktiven Moleküle verursacht wurde, hatte sich durch folgenden Versuch bestätigen lassen:

Bovines 125-J-TSH wurde mit Probenpuffer bestehend aus 2 % SDS und 5 % Mercaptoäthanol versetzt, dann 10 min. bei 100°C erhitzt, so daß die Tracermoleküle desaggregieren, und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Das Molekulargewicht des TSH-Tracers befand sich nun - wie erwartet - bei 30000 D.

Für die Versuchsmethode I war allerdings eine Desaggregation des rezeptorbindenden, bovinen 125-J-TSH mit SDS nicht geeignet, da SDS das Hormon denaturiert, und damit das Bindungsverhalten des TSH-Tracers an seinen Rezeptor empfindlich stören würde.

Zu Versuchsmethode I läßt sich festhalten:

Sie erbrachte zwar **visuell** die Bestätigung, daß TDA⁺⁺⁺-IgG eine kompetitive Wechselwirkung mit 125-J-TSH um die Bindungsstellen am TSH-Rezeptor eingeht. Bei dem Ziel dagegen, den TSH-Rezeptor vom Molekulargewicht her zu klassifizieren, war sie nicht erfolgreich.

4.5. Ergebnisse der Versuchsmethode II: Immunoblotting solub. Schilddrüsenmembranen mit Antigennachweis mittels humaner Antikörper (Methode: 3.2.)

4.5.1. Blottingkinetik: Quantitativer Transfer 125-J-markierter Schweine-SD-Membranen vom Gel auf Zetabinde und Nitrocellulose in Abhängigkeit von der Zeit (Methode. 3.2.2.3.)

Gemessen wurde der quantitative Transfer von 125-Jod-markierten Schweine-Schilddrüsenmembranen von Polyacrylamidgelen (PAA 4/20) auf a) Nitrocellulose und b) Zetabinde in Abhängigkeit von der Zeit.

Die auf die Matrix transferierte Aktivität der Membranen ($=A$) ist mit der auf das Gel aufgetragenen Ausgangsaktivität ($=A_0$) verglichen worden: Prozentualer Transfer = $\frac{A}{A_0} \times 100 \%$.

Das Ergebnis der Blottingkinetik ist in Abbildung 22 dargestellt.

Blotting-Kinetik
prozentualer Transfer von ^{125}J -SSM an

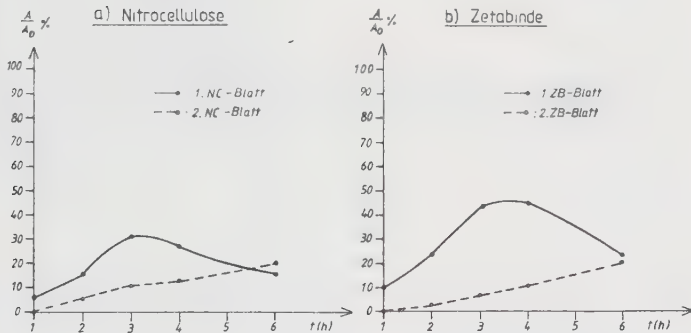


Abbildung 22: Blotting-Kinetik: Prozentualer Transfer von ^{125}J -SSM von PAA 4/20-Gelen auf a) doppelagige Nitrocellulose und b) doppelagiges Zetabinde in Abhängigkeit von der Zeit.
A = transferierte Aktivität
 A_0 = Ausgangsaktivität

Sowohl Nitrocellulose als auch Zetabinde hatten nach 3 - 4 Stunden Blotdauer ein Aktivitätsmaximum an transferierten Membranen, das für die erste Nitrocelluloselage bei 32 % und für die erste Lage Zetabinde bei 46 % transferierter Aktivität lag. D.h. die immobilisierende Matrix Zetabinde zeigte eine höhere Bindungskapazität als Nitrocellulose.

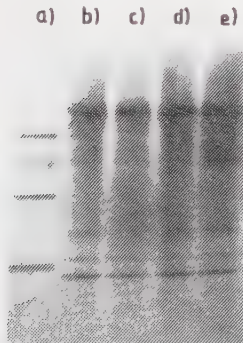
Beide Matrices waren - wie an der Aktivität der zweiten Matrixlage zu sehen - probendurchlässig; die Probendurchgängigkeit stieg bei beiden Matrices mit zunehmender Blottingdauer.

Ein Fixieren der Matrix mit 0,5 % Glutaraldehyd nach Proteinblot erbrachte keine Erhöhung der Probenaktivität der Matrix, weshalb in weiteren Versuchen das Fixieren entfiel.

4.5.2. Beispiel des Blots solubilisierter SSM und Blottingparameter (Methode: 3.2.2.)

Abbildungung 23 A - C zeigt ein Beispiel des Proteinblots.

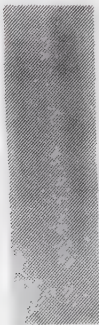
A: Gel vor Blot



Abbildungung 23 A: Rechte Hälfte eines PAA 4/20-Gels vor Proteinblot mit Coomassie Blue angefärbt.
Proben:

- a) HMW-Markerproteine (669 000, 440 000, 232 000, 140 000 und 67 000 D, von oben nach unten)
 - b) solub. SSM mit 0,15 mg Protein
 - c) solub. SSM mit 0,30 mg Protein
 - d) solub. SSM mit 0,45 mg Protein
 - e) solub. SSM mit 0,60 mg Protein
- Probenlauf bei: 200 V, 50 mA, 10°C, 17 Stunden.

B: Blot auf ZB:



Abbildungung 23 B: Zetabinde angefärbt mit Eisenchlorid-Tannin nach 3stündigem Proteinblot.

Blottingbedingungen: 70 V
600 - 1000 mA, 0°C, 3 Stunden.

C: Gel nach Blot

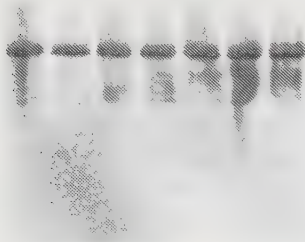


Abbildung 23 C: Linke Hälfte des PAA 4/20-Gels gefärbt mit Coomassie Blue nach 3-stündigem Proteinblot.

Aus Abbildung 23 C geht hervor, daß der Proteinblot gestaffelt erfolgte: Die niedermolekularen Proteine waren nach 3stündigem Blot praktisch vollständig auf die Matrix abgewandert. Die Proteine im hochmolekularen Bereich bis 440 000 Dalton dagegen waren noch teilweise auf dem Gel anfärbbar, gleichzeitig aber schon auf der Matrix zu erkennen (Abbildung 23 B). Das heißt, kleine Proteine gelangten in gleicher Zeit schneller auf die Matrix als großmolekulare Proteine.

Der Proteintransfer vom Gel auf die Matrix war nicht nur abhängig vom Molekulargewicht der Proben, sondern auch von der Dicke des verwendeten Polyacrylamid-Gels. Bei den von Pharmacia verwendeten 2,5 mm dicken PAA 4/30 - Gradientengelen war auch nach über 4 Stunden Blotdauer bei 70 V und 500 - 1000 mA färberisch kein wesentlicher Transfer der Proteine vom Gel auf die Matrix zu erkennen (siehe Abbildung 24). Die 1,5 mm dicken PAA 4/20-Gele dagegen zeigten schon nach 3 Stunden Blotdauer einen weitgehenden Proteintransfer (siehe Abbildung 23).

Gel nach Blot



Abbildung 24: PAA 4/30 Pharmacia-Gel mit 2,5 mm Dicke angefärbt nach 4,5 Std. Blotdauer.
Blottingbedingungen: 70 V, 500 - 1000 mA, 0°C, 4,5 Stunden.

4.5.3. Bindungskinetik von bovinem 125-J-TSH an Zetabinde (Methode: 3.2.3.3.)

Ziel dieser Untersuchung war es, die optimale Inkubationsdauer des bovinen TSH-Tracers an die an Zetabinde gebundenen Schilddrüsenmembranen zu ermitteln.

Das Ergebnis der Bindungskinetik ist in Abbildung 25 dargestellt.

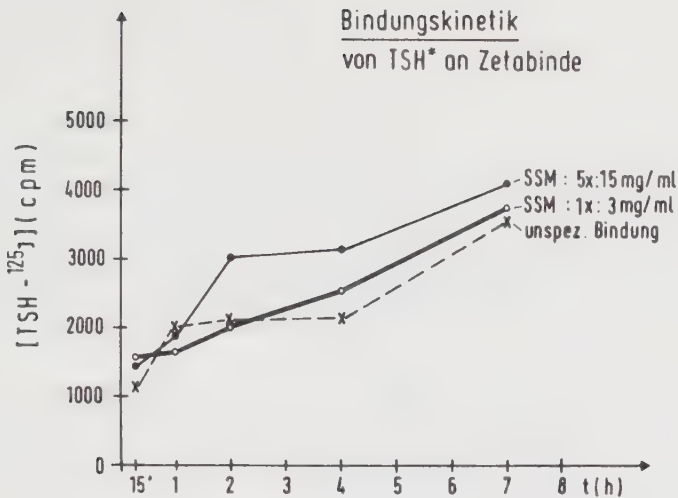


Abbildung 25: Bindungskinetik von ^{125}I -TSH an an Zetabinde gebundene solubilisierete Schweine-SD-Membranen.

Abszisse: Inkubationsdauer der membranhaltigen Zetabindeplättchen

Koordinate: ^{125}I -TSH-Aktivität der membranhaltigen Zetabindeplättchen in cpm (bei 6500 cpm Tracerausgangsaktivität = 100 %)

SSM 1x: solub. Schweine-SD-Membranen mit 3 mg/ml Protein

SSM 5x: solub. Schweine-SD-Membranen mit 15 mg/ml Protein

Die konzentrierten Membranen mit 15 mg/ml Protein zeigten die höchste Bindung von ^{125}I -TSH, die sich am deutlichsten nach 2 - 4 Stunden Inkubationsdauer bei Raumtemperatur von der unspezifischen Bindung abhob. Die Membranen mit 3 mg/ml dagegen lagen mit ihrer Aktivität nicht wesentlich über der unspezifischen Bindung. Die unspezifische Bindungsaktivität des TSH-Tracers an Zetabinde

war trotz vollständiger Absättigung der Matrix relativ hoch. Sie betrug nach 2 - 4 Stunden Inkubationsdauer ca. 2000 cpm und damit 31 % der Tracerausgangsaktivität (6500 cpm = 100 %). Die Aktivität der fünffach-konzentrierten Membranen mit 15 mg/ml Protein betrug für den gleichen Zeitraum ca. 3100 cpm, was 48 % der Tracerausgangsaktivität entsprach. Daraus resultierte eine spezifische Bindung der SSM 5x von 17 % nach 2 - 4 Stunden Inkubationsdauer bei Raumtemperatur. Vergleichend hierzu betrug die spezifische Bindung der SSM 5 x im TDA-Assay 20 %, bei einer unspezifischen Bindung von 1 - 3 % (siehe 4.2.1., Tabelle 2 und Tabelle 5).

Die Inkubation der geblotteten Matrix mit 125-J-TSH länger als 4 Stunden führte zu einer Erhöhung der unspezifischen Bindung, bei gleichzeitig geringer Abnahme der spezifischen Membranbindung.

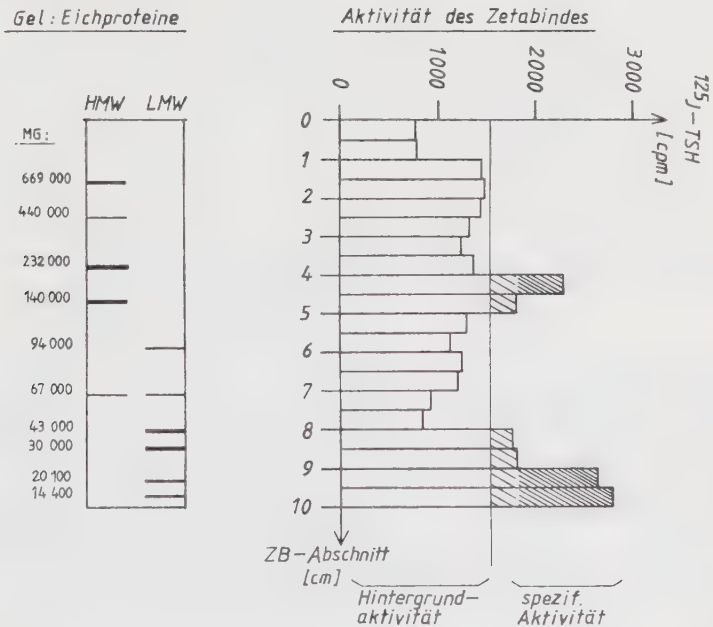
4.5.4. Inkubation der geblotteten Matrix mit bovinem 125-J-TSH als ersten Liganden (Methode: 3.2.3.2.)

In Triton solubilisierete Schweine-Schilddrüsenmembranen mit 15 mg/ml Protein sind auf einem PAA 4/20 Gel (bei 0,6 - 0,7 mg Protein pro Auftragsstelle) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf Zetabinde geblottet worden. Die geblottete Matrix ist für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit bovinem 125-J-TSH inkubiert und nach Waschen gleichmäßig in 0,5 cm-Abschnitte zerteilt worden. Die Aktivität der Zetabinde-Abschnitte wurde im Gamma-Counter gemessen. Anhand der in der Elektrophorese mitgelaufenen Eichproteine erfolgte die Darstellung der Aktivitätsverteilung des 125-J-TSH auf der Matrix. Das Ergebnis ist in Abbildung 26 dargestellt.

Auf der geblotteten Matrix wurden zwei Bereiche mit erhöhter Aktivität gefunden:

- a) im Molekulargewichtsbereich von 180 000 - 220 000 D
- und
- b) im Molekulargewichtsbereich kleiner 24 000 D.

Als spezifische TSH-Rezeptorbande ist wahrscheinlich der Aktivitätspeak im Bereich 180 000 - 220 000 Dalton anzusehen. Die Aktivitätserhöhung im Bereich kleiner 24 000 Dalton ist eventuell auf TSH-Rezeptorbruchstücke zurückzuführen, die beim Solubilisieren der Schilddrüsenmembranen entstanden sind.



Erhöhte Aktivität im Bereich:

- a) 4,0 - 4,5 cm ~ 180 000 - 220 000 D
- b) < 9,0 cm ~ < 24 000 D

Abbildung 26: Aktivitätsverteilung des 125-J-TSH auf der geblotteten Matrix.

links: PAA 4/20-Gel mit Eichproteinen:
HMW und LMW-Markerproteine
rechts: Zetabinde mit Aktivitätsverteilung

4.5.5. Inkubation der geblotteten Matrix mit Hu-IgG als
1. Antikörper und Miles-Ak als 2. Antikörper
(Methode: 3.2.3.4. und 3.2.3.5.1.)

In Triton solubilisierte Schweine-SD-Membranen wurden auf einem PAA 4/20-Gel (mit 0,6 - 0,7 mg Protein pro Auftragsstelle) elektrophoretisch aufgetrennt und auf Zetabinde geblottet. Die geblottete Matrix wurde für 2 Stunden bei RT mit humanem IgG und weitere 2 Stunden bei RT mit Anti-Hu-IgG-POD (= Miles-Ak) inkubiert. Es folgte die Färbung der POD-gekoppelten Moleküle der Matrix mit Chloronaphtol.

Als erste Antikörper sind verwendet worden: TDA⁺⁺⁺- und TDA⁺⁺-Pool-IgG, sowie TDA⁻-Pool-IgG.

Das Molekulargewicht der sich anfärbenden Antigenbanden der Matrix wurde anhand der in der Elektrophorese mitgelaufenen Eichproteine bestimmt.

Abbildung 27 zeigt eine Zusammenstellung des Ergebnisses.

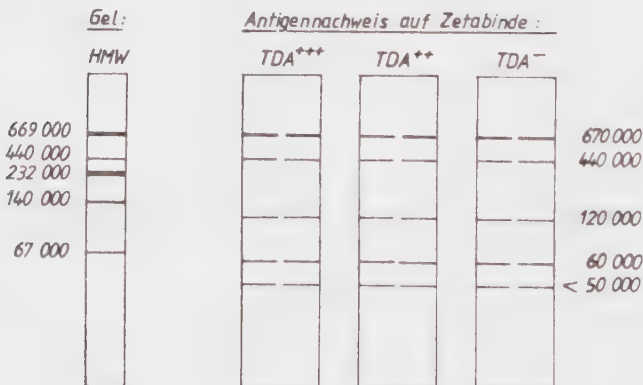


Abbildung 27: Ergebnis der Inkubation der geblotteten Matrix mit Hu-IgG als 1. Ak und Miles-Ak als 2. Ak.
 links : PAA 4/20 Gel mit HMW-Eichproteinen
 rechts : Antigenbanden der geblotteten Matrix nach Chloronaphtolfärbung bei Inkubation mit: TDA⁺⁺⁺-, TDA⁺⁺- und TDA⁻-IgG als 1. Ak.

Schwierigkeiten bei dieser Versuchsmethode bereitete die starke Hintergrundfärbung der Matrix nach Chloronaptholfärbung, die durch Kreuzreaktionen des 1. und 2. Antikörpers mit dem Absättigungsmittel der Matrix zustande kam. Die Hintergrundreaktion war sowohl bei Verwendung von BSA als auch bei Verwendung von fKS und bovinem Hämoglobin, die alle als Absättigungsmittel in der Literatur beschrieben sind, in etwa gleicher Intensität vorhanden.

Soweit sich die Antigenbanden auf der geblotteten Matrix vom Hintergrund abgrenzen ließen, war das Bandenmuster bei Inkubation mit TDA⁺⁺⁺-, TDA⁺⁺- und TDA⁻-IgG identisch. Es fanden sich je 5 Banden mit einem Molekulargewicht von 670000, 440000, 120000, 60000 und kleiner 50000 Dalton. Das heißt, praktisch ließen sich bei Verwendung eines 2. Antikörpers ohne Verstärkungsprinzip nur unspezifische, aber keine spezifischen Banden darstellen.

4.5.6. Inkubation der geblotteten Matrix mit Hu-IgG als 1. Ak und ABC-Vectastain^R als 2. Ak (Methode: 3.2.3.4. und 3.2.3.5.2.)

Aufgrund des negativen Ergebnisses bei der Verwendung des Miles-Ak zum Antigennachweis ist daraufhin ein 2. Antikörper mit Verstärkungseffekt verwendet worden - in der Vorstellung, dadurch eine höhere Empfindlichkeit zum Nachweis des TSH-Rezeptors zu erhalten, und damit weitere Oberflächenantigene der Schilddrüse darstellen zu können. Dieser 2. Antikörper bestand aus einem Anti-Hu-IgG-Avidin-Biotin-POD-System.

In Triton solubilisierete Schweine-SD-Membranen wurden auf einem PAA 4/20-Gel (mit 0,6 - 0,7 mg Protein pro Auftragsstelle) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend

auf Zetabinde geblottet. Die geblottete Matrix wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur mit humanem IgG und 40 min. bei RT mit Anti-Hu-IgG*Biotin inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation mit Avidin-Biotin-POD-Lösung für 30 min. (siehe 3.2.3.5.2.) wurde die Matrix mit Chloronaphtol angefärbt.

4.5.6.1. TDA⁺⁺⁺- und TDA⁻-Pool-IgG als 1. Ak

Bei Verwendung von TDA⁺⁺⁺- und TDA⁻-Pool-IgG als erste Antikörper, sowie ABC-Vectastain^R als zweiten Antikörper zeigte sich folgendes "Antigenmuster" (siehe auch Abbildung 28):

Neben wiederum unspezifischen Banden im Molekulargewichtsbereich von 670000, 440000, 60000 und kleiner 50000 Dalton, die nur schwer von der Hintergrundfärbung abzugrenzen waren, stellte sich im TDA⁺⁺⁺-Abschnitt zusätzlich eine Bande bei 200000 D dar, die auf dem TDA⁻-Kontrollabschnitt nicht zu sehen war.

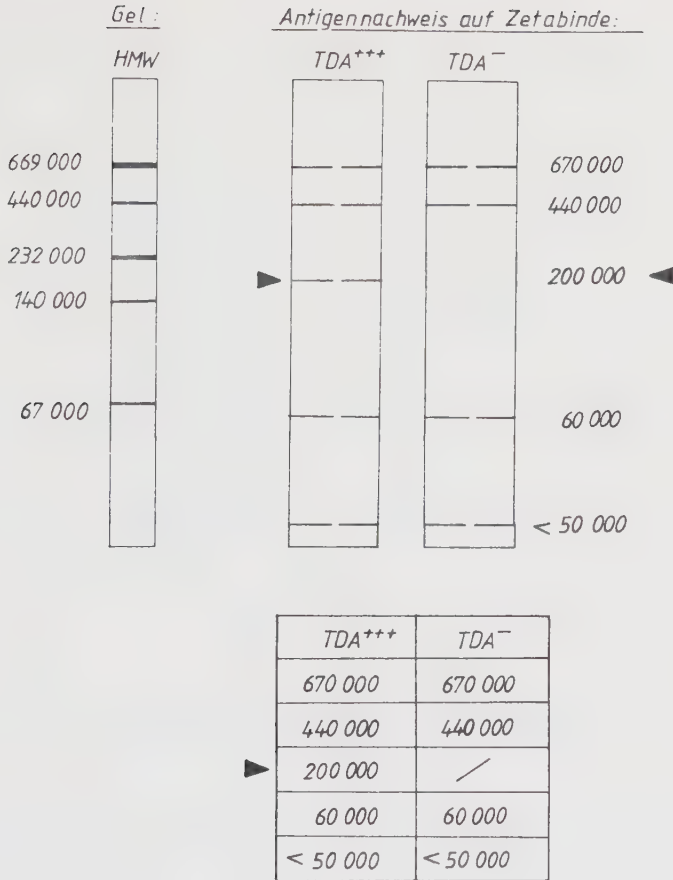


Abbildung 28: Ergebnis der Inkubation der geblotteten Matrix mit Hu-IgG als 1. Ak und ABC-Vectastain^R als 2. Ak
 links: PAA 4/20 Gel mit HMW-Eichproteinen
 rechts: Antigenbanden der geblotteten Matrix nach Chloronaphtolfärbung bei Inkubation mit TDA⁺⁺⁺- und TDA⁻-IgG als 1. Ak.

4.5.6.2. TGI-positives Patienten-IgG (A 2) als 1. Ak

Die geblottete Matrix war in diesem Falle mit dem IgG eines Patienten, der an einer nicht immunogen bedingten Rezidivstruma litt, inkubiert worden. Das präparierte IgG dieses Patienten (= IgG A 2) hatte im TGI-Assay eine Wachstumsrate der Follikelepithelzellen um Faktor 6 bewirkt (näheres siehe unter 4.3.). Als Kontroll-IgG war wiederum TDA⁻-Pool-IgG verwendet worden.

Nach Inkubation der Matrix mit ABC-Vectastain^R als 2. Antikörper und Chloronaphtolfärbung ergab sich folgendes Bandenmuster:

Soweit vom Hintergrund abgrenzbar - waren das Antigenmuster im TGI⁺⁺⁺- und TDA⁻-Abschnitt identisch. Es fanden sich jeweils 4 Banden im Molekulargewichtsbereich von 670000, 440000, 60000 und kleiner 50000 Dalton, die somit als unspezifische Banden einzustufen waren.

4.5.6.3. TDA-positives IgG verschiedener Patienten als 1. Ak

IgG-Präparationen verschiedener Patienten mit immunogen bedingten Schilddrüsenerkrankungen, die im TDA-Assay eindeutig positive Werte (TDA einfach bis zweifach positiv) aufwiesen, sind zur Inkubation der geblotteten Matrix verwendet worden. Zweiter Ak ist wiederum ABC-Vectastain^R gewesen.

Eine Auswertung der Versuche hat sich insofern als schwierig erwiesen, als eine Abgrenzung der Bandenmuster von Hintergrundreaktionen auf der Matrix in diesen Fällen nicht möglich gewesen ist.

4.5.7. Inkubation der geblotteten Matrix mit TgAk als

1. Ak und Anti-TgAk-POD als 2. Ak (Methode: 3.2.4.)

Dieser Versuch diente der Überprüfung der technischen Schritte der Versuchsmethode 3.2. (Immunoblotting solub. SSM mit Antigennachweis).

In Triton solubilisierete Schweine-SD-Membranen (mit 30 µg Protein/slot) wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf Zetabinde geblottet.

Statt des Nachweises von Oberflächenantigenen der Schilddrüse wurde jetzt ein Nachweis von Thyreoglobulin-Antigenen der Membranproteine durchgeführt. Die geblottete Matrix wurde für 2 Stunden bei RT mit Tg-Ak-IgG (= 1. Antikörper) und weitere 2 Stunden mit Anti-Tg-Ak-IgG*POD (= 2. Antikörper) bei RT inkubiert. Es folgte die Anfärbung der Matrix mit Chloronaphthol.

Trotz der ca. 1/20 geringeren Ausgangsmenge an Schilddrüsenmembranen - verglichen mit der Menge, die für den Nachweis der Oberflächenantigene verwendet wurde - und trotz der Verwendung eines 2. Antikörpers ohne Verstärkungsprinzip waren in diesem Fall deutlich Antigenbanden von der Hintergrundfärbung abgrenzbar (siehe Abbildung 29): Es stellten sich 6 Banden dar im Molekulargewichtsbereich von 6700000, 650000, 450000, 430000, 160000 und 100000 Dalton.

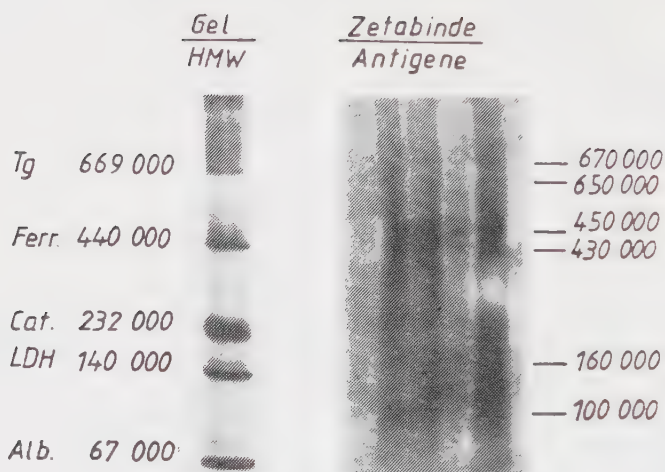


Abbildung 29: Ergebnis der Inkubation der geblotteten Matrix mit TgAk als 1. Ak und Anti-TgAk-POD als 2. Ak

links: PAA-Gel mit HMW-Eichproteinen
rechts: Antigenbanden der geblotteten Matrix nach Chloronaphtolfärbung bei Inkubation mit TgAk als 1. Ak

Zusammenfassend läßt sich zu Versuchsmethode II sagen, daß sie theoretisch als Screeningmethode zum Nachweis für Oberflächenantigene der Schilddrüsenzelle ideal geeignet wäre, in der Praxis aber Schwierigkeiten auftraten, die darin bestanden, daß nach Chloronaphtolfärbung der Matrix aufgrund der starken Hintergrundreaktion eine sichere Beurteilung des Antigenbandenmusters in vielen Fällen nicht möglich gewesen ist.

Das eigentliche Problem bestand aber wohl vielmehr in der geringen Menge an TSH-Rezeptor- bzw. Antigenmaterial in den präparierten Membranproben und einer zu geringen Affinität zwischen Antigen (= TSH-Rezeptor) und Antikörper (= Hu-IgG gegen TSH-Rezeptoren bzw. gegen Oberflächenantigene allgemein).

4.6. Ergebnis der Versuchsmethode III: Immunextraktion von spezifisch bindendem 125-J-markiertem Antigenmaterial durch IgG-Affinitätschromatographie über Protein-A-Sepharose (Methode: 3.3.)

Schweine-SD-Membranen wurden mit 125-Jod markiert und in Triton solubilisiert. Es folgte die Inkubation der solub. 125-J-SSM in verschiedenen Ansätzen mit TDA⁺⁺⁺- und TDA⁻-IgG, sowie mit kaltem bovinem TSH. Der spezifische 125-J-Ag-Ak-Komplex wurde durch Chromatographie über Protein-A-Sepharose abgetrennt, anschließend konzentriert und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Darstellung der Elektrophorese erfolgte autoradiographisch. (Siehe Methode 3.3.)

Ausgehend von 2×10^6 cpm Aktivität der 125-J-SSM pro Probenansatz verblieben nach Elution über Protein-A-Sepharose als "spezif. Aktivität" bei

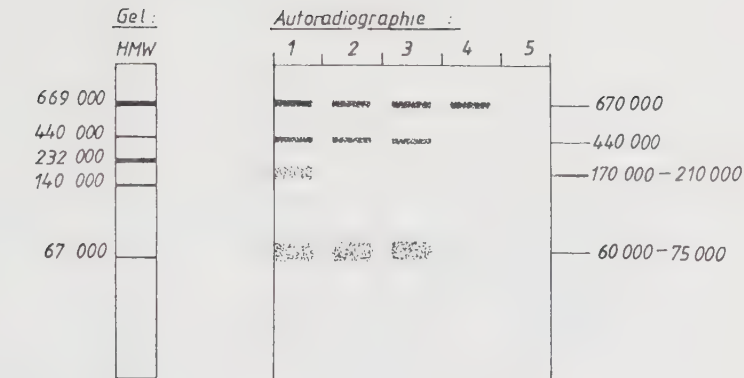
Probe 1: 125-J-SSM + TDA ⁺⁺⁺ -IgG	:501 140 cpm	0,226 µCi
Probe 2: 125-J-SSM + TDA ⁺⁺⁺ -IgG+TSH	:477 630 cpm	0,215 µCi
Probe 3: 125-J-SSM + TDA ⁻ -IgG	:394 710 cpm	0,178 µCi
Probe 4: 125-J-SSM + TDA ⁻ -IgG+TSH	:466 630 cpm	0,210 µCi
Probe 5: 125-J-SSM + Puffer	:208 040 cpm	0,094 µCi

Verglich man die über Protein-A-Sepharose spezifisch eluierten Aktivitäten der verschiedenen Proben unterein-

ander, zeigte sich, daß innerhalb der "spezifischen Aktivität" ein sehr hoher Anteil an unspezifischen Bindungen vorhanden war. Es existierten sowohl unspezifische Bindungen von radioaktivem Membranmaterial direkt an Protein-A (= Probe 5), als auch von TDA⁻-IgG an die 125-J-markierten Membranen (= Probe 3 und 4). Eine Verdrängung des TDA⁺⁺⁺-IgG von den 125-J-SSM durch kaltes TSH (= Probe 2) machte sich nur durch eine geringe Abnahme der Probenaktivität um etwa 5 % (Probe 1 = 100 %) bemerkbar.

Bei der sich anschließenden Konzentrierung der Proben durch TCA-Fällung konnten nur jeweils ca. 10 % der spezifisch eluierten Aktivität gefällt werden, so daß die Aktivität der Proben für die Autoradiographie nur wenig über der unteren Nachweisgrenze des Röntgenfilms lag.

Abbildung 30 zeigt das Ergebnis der Autoradiographie nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben 1 - 5.



SSM*+

1: TDA ⁺⁺⁺	2: TDA ⁺⁺⁺ + TSH	3: TDA ⁻	4: TDA ⁻ + TSH	5: Puffer
670 000	670 000	670 000	670 000	/
440 000	440 000	440 000	/	/
170-210 000	/	/	/	/
60-75 000	60-75 000	60-75 000	/	/

auf Position 4 u. 5: Aktivität für Autoradiographie
nicht ausreichend

Abbildung 30: Ergebnis der Autoradiographie der Versuchsmethode III.

Rechts: Autoradiographie auf Kodak-Ortho-H Röntgenfilm nach 8 Tagen Belichtung

Pos. 1: 125-J-SSM + TDA⁺⁺⁺ - IgG

Pos. 2: 125-J-SSM + TDA⁺⁺⁺ - IgG + TSH

Pos. 3: 125-J-SSM + TDA⁻ - IgG

Pos. 4: 125-J-SSM + TDA⁻ - IgG + TSH

Pos. 5: 125-J-SSM + Puffer

Links: Gel: PAA 4/20 mit HMW-Eichproteinen
Lauf: 200 V, 50 mA, 10°C, 16 Std.

Auf der Autoradiographie waren - ebenso wie in Versuchsmethode II - unspezifische Banden im Molekulargewichtsbereich von 670000, 440000 und 60000 - 75000 Dalton zu erkennen.

Die Antigenbande im Bereich 170000 - 210000 Dalton war nur bei Inkubation der 125-J-SSM mit TDA⁺⁺⁺-IgG vorhanden (= Position 1). Nach Zugabe von kaltem TSH war diese Bande nicht mehr nachzuweisen (= Position 2), so daß es sich um ein spezifisch durch TSH verdrängbares Schilddrüsenantigen handeln mußte.

Diese Antigenbande entsprach vom Molekulargewicht in etwa dem in 4.5.4. gefundenen 125-J-TSH-Bindungspeak an Schilddrüsenmembranmoleküle von 180000 - 220000 D (siehe Abbildung 26), sowie der spezifischen Antigenbande von 200000 D in Versuchsmethode II nach Inkubation mit TDA⁺⁺⁺-IgG.

4.7. Ergebnis der Versuchsmethode IV: Immunextraktion von spezifisch bindendem 125-J-markiertem Antigenmaterial durch IgG-Affinitätschomatographie über Protein-A-Sephrose bei modifizierter radioaktiver Markierung (Methode 3.4.)

Schilddrüsenfollikelzellen wurden mit 125-Jod unter Perchloratinkubation markiert mit dem Ziel, eine Jodaufnahme in die Zelle zu verhindern und damit eine höhere Radiojodmarkierung speziell der Membranproteine an der Zelloberfläche zu erreichen. Die markierten Zellen wurden anschließend lysiert und in 1 % Triton solubilisiert. Die 125-J-SSM besaßen nach Verdünnung eine Aktivität von 700000 cpm/100 µl. Die markierten Membranen wurden mit

TDA⁺⁺⁺-Serum (B 1, siehe 4.3.), sowie TGI⁺⁺⁺-Serum (A1 und B 3, siehe 4.3.) mit und ohne Zusatz von TSH bzw. EGF inkubiert. Als Kontrolle diente TDA⁻-Serum.

EGF (epidermal-growth-factor) ist ein Faktor, der das Wachstum isolierter Schilddrüsenfollikelzellen stimuliert (20, 28).

Der "spezifisch" reagierende 125-J-Antigen-Antikörper-Komplex (= 125-J-SSM-TDA⁺⁺⁺-IgG bzw. 125-J-SSM-TGI⁺⁺⁺-IgG) wurde durch Elution über Protein-A-Sepharose Gel abgetrennt und anschließend im Gamma-Counter gemessen.

Die Aktivität der Probenansätze nach Chromatographie über Protein-A-Sepharose Gel betrugen:

1) 125-J-SSM + TDA⁺⁺⁺-Serum (= B 1)

- a) + Puffer: 6750 cpm
- b) + TSH: 5700 cpm
- c) + EGF: 6600 cpm

2) 125-J-SSM + TGI⁺⁺⁺-Serum (= A 1)

- a) + Puffer: 13380 cpm
- b) + TSH: 14100 cpm
- c) + EGF: 14480 cpm

3) 125-J-SSM + TGI⁺⁺⁺-Serum (= B 3)

- a) + Puffer: 8940 cpm
- b) + TSH: 8000 cpm
- c) + EGF: 9000 cpm

4) 125-J-SSM + TDA⁻-Serum

- a) + Puffer: 3200 cpm
- b) + TSH: 3480 cpm
- c) + EGF: 3660 cpm

- Ausgangsaktivität an 125-J-SSM pro Probenansatz:
ca. 700 000 cpm
- Werte des spezif. Eluats nach Chromatographie über
Protein-A-Sepharose: in cpm/3 ml Gesamteluat

- Nach Inkubation von 125-J-SSM mit TDA⁺⁺⁺-Serum (= Ansatz 1) und Zugabe von TSH erhielt man eine geringe Abnahme der Probenaktivität durch TSH, die ca. 16 % betrug (bei 125-J-SSM + TDA⁺⁺⁺-Serum + Puffer = 100 %). EFG-Zugabe erbrachte keine Abnahme der Probenaktivität. Dies war nach Austestung des Serums unter 4.3. auch nicht zu erwarten, da hier keine wachstumsstimulierende Wirkung im TGI-Assay nachgewiesen werden konnte.
- Die Probenansätze 2 und 3 erfolgten mit Patientenserum, die im TDA-Assay eindeutig negativ waren, d.h. keine TSH-Rezeptor-Ak aufwiesen (= TDA⁻), die aber im TGI-Assay deutlich wachstumsstimulierend auf die Schilddrüsenfollikelzellen wirkten (= TGI⁺⁺⁺). Näheres siehe unter 4.3., Seren A 1 und B 3. In diesem Versuch allerdings war bei den TGI⁺⁺⁺-Seren nach EGF-Zugabe keine Abnahme der Probenaktivität und damit spezifische Verdrängung durch EGF zu verzeichnen.
- Das Kontrollserum (= TDA⁻) zeigte, wie erwartet, weder nach TSH- noch nach EGF-Zugabe eine Abnahme der Probenaktivität.

Eine genauere Analyse des "spezifisch eluierten" Probenmaterials durch Elektrophorese und autoradiographische Darstellung (wie in Versuchsmethode 3.3.) - zur Erhöhung der Aussagefähigkeit - konnte nicht durchgeführt werden, da die gewonnenen Probenaktivitäten für eine Autoradiographie auf Röntgenfilm nicht ausreichten.

Aufgrund der ermittelten Aktivitätswerte des spezifisch eluierten Membranmaterials ließe sich folgendes ableiten und alternativ diskutieren:

- Der Assay ist zum Nachweis des "TGI-Antigens" nicht sensitiv genug.
- TGI als postuliertes Immunglobulin bindet weder an den TSH- noch an den EGF-Rezeptor.
- Die wachstumsstimulierende Wirkung der "TGI" wird nicht durch Gamma-Immunglobuline, sondern durch primär wachstumsstimulierende Substanzen (z.B. EGF) hervorgerufen, die durch die IgG-Affinitätschromatographie über Protein-A-Sepharose allerdings nicht erfaßt werden und somit im Inkubationsansatz : 125-J-SSM + "TGI" + EGF nach IgG-Affinitätschromatographie keine Verdrängungsaktivität zeigen können. Diese These setzt allerdings voraus - um es mit dem Versuchsergebnis 4.3. vereinbaren zu können -, daß diese primär wachstumsstimulierenden Substanzen in der IgG-Präparation mitherausselektiert werden.

5. DISKUSSION

Thema dieser Arbeit war die Untersuchung von Oberflächenantigenen der Schilddrüsenzellmembran mittels humaner Antikörper. Von Interesse war dabei insbesondere der Angriffspunkt der TSH-Rezeptor-Antikörper an der Schilddrüsenzellmembran.

Diese TSH-Rezeptor-Antikörper, die vor allen Dingen in der Diagnostik immunogener Schilddrüsenerkrankungen ein zunehmendes wissenschaftliches Interesse finden, stellen keine einheitliche IgG-Klasse dar, sondern setzen sich pathophysiologisch aus drei Untergruppen zusammen:

- a) thyroid-stimulating immunoglobulins (TSI) - (3, 37)
- b) TSH-binding-inhibitor immunoglobulins (TBII) - (2, 15)
- c) thyroid-growth-stimulating immunoglobulins (TGI) - (13, 18)

Die Untersuchung der TSH-Rezeptor-Antikörper ist ein relativ neues Forschungsgebiet, so daß viele Fragen über diese Antikörpergruppe in der Literatur bisher unbeantwortet blieben, u.a. die Fragen:

- 1) Existieren bei immunogenen Schilddrüsenerkrankungen auch verschiedene Antikörperprofile gegen unterschiedliche Oberflächenantigene der Schilddrüsenzellmembran? Greifen damit die "thyroid-stimulating immunoglobulins" außer an den TSH-Rezeptor - wie bisher vermutet - auch an weitere antigen wirkende Membranstrukturen an?

In der Literatur wurde bisher nur für die "TSH-binding-inhibitor immunoglobulins" versucht, das antigene Verteilungsmuster an der Schilddrüsenzellmembran darzustellen:

Heyma und Harrison (31) untersuchten 1984 das Bindungsverhalten von TBII an humanen Schilddrüsenmem-

branen: Hierzu verwendeten sie die Seren von M. Basedow-Patienten, die im TDA-Assay die Bindung von 125-J-TSH an seinen Rezeptor um 30 bis 80 % reduzierten. In ihrem Versuchsansatz inkubierten sie humane 125-J-markierte Schilddrüsenmembranen mit den Seren dieser M. Basedow-Patienten. Durch Zugabe einer Staphylococcus aureus A - Suspension fällten sie den spezifischen 125-J-Antigen*TBII-Komplex aus. Der Immunkomplex wurde anschließend in SDS-haltigen Elektrophoresepuffer aufgenommen, erhitzt und unter reduzierenden Bedingungen auf einem Polyacrylamid-Gel nach dem System nach Lämmli elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend getrocknet und autoradiographiert. Dabei zeigte sich, daß unter reduzierenden Bedingungen das TBII-haltige Serum spezifisch an Schilddrüsenantigene mit einem reduzierten Molekulargewicht von a) 100000 - 110000 Dalton b) 80000 - 90000 D und c) 70000 - 75000 D gebunden hat. Heyma und Harrison setzten diese Antigenbanden dem humanen TSH-Rezeptor gleich, konnten aber in einem zweiten Versuch nicht zeigen, daß diese spezifischen "Basedow-Antigenbanden" durch TSH verdrängbar waren. Damit läßt dieser Versuch praktisch die Frage offen, ob die Immunglobuline bei M. Basedow an den TSH-Rezeptor binden.

In der Literatur ebenfalls noch nicht geklärt ist die Frage

- 2) Ob "thyroid-growth-stimulating immunoglobulins", also Immunglobuline mit wachstumsstimulierender Wirkung auf die Schilddrüse, wirklich über den TSH-Rezeptor wirksam sind und damit eine Klärung der Frage, inwieweit das immunogen bedingte Wachstum der Schilddrüse über den TSH-Rezeptor vermittelt wird.

Die Annahme, daß diese "thyroid-growth-stimulating immunoglobulins" TSH-Rezeptor-Antikörper darstellen, stützt sich bisher auf Untersuchungen im sogenannten TGI-Assay, in dem das Wachstum vitaler Schilddrüsen-follikelzellen nach IgG-Stimulation durch Messung des Einbaus von ^3H -Thymidin in die DNA der Schilddrüsenzelle gemessen werden kann.

Um der Beantwortung dieser Fragen näher zu kommen, war es nötig, eine Methode zur Darstellung von Oberflächenantigenen der Schilddrüsenzellmembran zu entwickeln. Hierfür kam methodisch eine hochauflösende Dichtegradienten-Elektrophorese in Betracht, um so die präparierten und solubilisierten Schweineschilddrüsenmembranen in - nach Molekulargewicht geordnete - Fraktionen aufzutrennen mit der anschließenden Untersuchung, ob TSI- bzw. TGI-Seren eine spezifische Bindung an bestimmte Membranfraktionen vorzuweisen haben. Mit Hilfe der Proteinelektrophorese sollte damit:

- a) der Angriffspunkt der TSH-Rezeptor-Antikörper an den elektrophoretisch aufgetrennten Membranproteinen untersucht werden unter der Fragestellung, in welchem Molekulargewichtsbereich das spezifisch bindende Antigen der Schilddrüsenzellmembran anzusiedeln ist
- b) dargestellt werden, an welche Membranstrukturen der Schilddrüse die "thyroid-growth-stimulating immunoglobulins" (TGI) angreifen
- c) das Molekulargewicht des TSH-Rezeptors als postuliertes Membranantigen der TSH-Rezeptor-Antikörper bestimmt werden.

Die Charakterisierung des Molekulargewichtes des TSH-Rezeptors ist Gegenstand jahrelanger wissenschaftlicher Untersuchungen mit bisher unterschiedlichen Ergebnissen gewesen:

In der Literatur findet man im Wesentlichen zwei methodische Verfahren zur Darstellung des TSH-Rezeptors:

- einmal die Elution des TSH-Rezeptors aus solubilisierten Schilddrüsenmembranen durch Säulenchromatographie, mit anschließender Austestung, welche Elutionsfraktionen die größte Bindung für TSH aufweisen (12, 33, 49, 52, 58)
- zum anderen sehr aufwendige Verfahren, in denen Schilddrüsenmembranen entweder radioaktiv (31) oder mit lichtgebenden Substanzen (8) markiert und nach Inkubation mit TSH auf einem SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt wurden.

Das in diesen Untersuchungen gefundene Molekulargewicht des TSH-Rezeptors oder seiner Subfraktionen ist uneinheitlich und schwankt zwischen einem Molekulargewicht von 50000 bis 300000 Dalton abhängig vom methodischen Vorgehen. Zusammenfassend läßt sich aus diesen Untersuchungen ableiten, daß der TSH-Rezeptor ein sehr empfindliches Molekül ist, das wahrscheinlich aus mehreren Untereinheiten besteht.

Zur Untersuchung des Molekulargewichts des TSH-Rezeptors und zur Klärung der Frage, ob TSI- und TGI-Seren an spezifische Schilddrüsenantigenbanden binden, wurden folgende methodische Ansätze durchgeführt:

- TSH-Rezeptornachweis durch elektrophoretische Auftrennung eines Präinkubats von 125 -J-TSH, solub. Schilddrüsenmembranen und Human-IgG, Methode I (3.1.)
- Immunoblotting solubilisierter Schilddrüsenmembranen mit Antigennachweis mittels humaner Antikörper, Methode II (3.2.)
- Immunextraktion von spezifisch bindendem 125 -J-markiertem Antigenmaterial durch IgG-Affinitätschromatographie über Protein-A-Sepharose, Methode III (3.3.)

- Immunextraktion von spezifisch bindendem $^{125}\text{-J}$ -markiertem Antigenmaterial durch IgG-Affinitätschromatographie über Protein-A-Sepharose bei modifizierter radioaktiver Markierung, Methode IV (3.4.).

Voraussetzung für alle diese Versuchsmethoden war die Plasmamembranpräparation der Schilddrüsenzelle (2.1.1. und Abbildung 1), um das zu untersuchende Antigenmaterial anzureichern. Die präparierten Plasmamembranen stellen das in vitro-Modell der intakten Zellmembranoberfläche dar. Die Zellmembran besteht aus einer flüssigen Doppel-lipid-Schicht, in die metabolisch wirksame Membranproteine und -glycoproteine - unter anderem auch der TSH-Rezeptor - eingebaut sind. Um eine Anreicherung und Reinigung dieser Proteine zu erhalten, ist es sinnvoll, sie mit Hilfe eines Solubilisierungsdetergens aus der umgebenden Lipidhülle herauszulösen. Je nach Interaktion der Membranproteine mit den Membranlipiden (hydrophobe, hydrophile und amphipathische Wechselwirkungen) ist ein mehr lipophiles oder ionisches Solubilisierungsdetergens indiziert. Die Austestung verschiedener Detergentien für diesen Schritt (SDS, Zwittergent und Triton-X-100) wurde in 2.1.2. durchgeführt. Dabei zeigte sich nach elektrophoretischer Auftrennung der solubilisierten Membranen, daß in Triton solubilisierete Schweineschilddrüsenmembranen die höchste Ausbeute an Membranproteinen und die sauberste Auftrennung ergeben (siehe 4.1.). Triton-X ist ein lipophiles Detergens. Daraus läßt sich auf eine weitgehend hydrophobe Wechselwirkung der Oberflächenproteine der Schilddrüsenzelle mit ihrer Membranumgebung schließen.

Die Schwierigkeiten der Plasmamembranpräparation bestehen vor allen Dingen darin, das "richtige Antigenmaterial" ohne Denaturierung oder größeren Funktionsverlust anzureichern. Die erhaltene Bindungsfähigkeit für TSH der präparierten und in 1 % Triton solubilisierten Schweine-SD-Membranen wurde im TDA-Assay überprüft (siehe 2.2.

und 2.2.1.)). Gleichzeitig wurden Einflußparameter der Bindung - wie Proteinkonzentration und Stabilität der Membranen im TDA-Assay untersucht (2.2.3.). Für eine Proteinkonzentration an solubilisierten SSM von 15 mg/ml - wie sie auch in Versuchsmethode 3.2. verwendet wurde - ergab sich eine spezifische Bindung für TSH von ca. 20 % in frisch präpariertem Zustand. Die Stabilität solubilisierter SD-Membranen erwies sich als temperaturabhängig: Über einen Zeitraum von 24 Stunden war bei 4°C Umgebungstemperatur nur eine geringe Abnahme der spezifischen Bindung zu verzeichnen, während bei 24stündiger Inkubation bei Raumtemperatur die spezifische Bindung auf ca. 73 % absank (ausgehend von der spezifischen Bindung der Membranen in frisch solubilisiertem Zustand = 100 %). Dieser Faktor spielt insofern eine Rolle, als für die verwendeten Versuchsmethoden zur Charakterisierung von Oberflächenantigenen der Schilddrüsenzelle (siehe 3.1., 3.2., 3.3. und 3.4.) relativ lange Inkubationszeiten und zum Teil höhere Temperaturen erforderlich waren, so daß in diesen Versuchen mit einem Bindungsverlust der Membranen gerechnet werden mußte.

Ein Vergleich der Bindung von TSH an solubilierte Schweine- bzw. humane SD-Membranen im TDA-Assay zeigte, daß bei gleicher Proteinkonzentration die Empfindlichkeit der Schweinemembranen für TSH höher als die der humanen Membranen war. Deren geringere Empfindlichkeit für TSH läßt sich wohl dadurch erklären, daß das humane Schilddrüsengewebe aus Strumaresektionsmaterial stammte, das einen höheren Bindegewebsanteil und damit weniger Rezeptormaterial aufweist (siehe 4.2.2.).

Die Wirksamkeit **humaner** TSH-Rezeptor-Antikörper gegen solubilierte **Schweine**-SD-Membranen wurde ebenfalls im TDA-Assay nachgewiesen. Verglichen wurde die Verdrängung von TSH durch Patientenserum im

- a) heterologen System (humane Ak und Schweine-SD-Membranen) und im
- b) homologen System (humane Ak und humane SD-Membranen).

Diese Untersuchung war notwendig, da es bis zur Erstellung einer geeigneten Methodik für den Nachweis von Schilddrüsen-Membranantigenen mittels humaner Antikörper unmöglich war, auf eine so große Menge an humanem Schilddrüsenresektionsmaterial zurückzugreifen. Dagegen konnten Schweineschilddrüsen jederzeit frisch vom Schlachthof bezogen werden.

Im TDA-Assay ergaben sich für beide Systeme vergleichbare Verdrängungswerte. In 8 von 11 Fällen war sogar eine höhere Empfindlichkeit der Schweinemembranen für TSH-Rezeptor-Ak festzustellen (siehe 4.2.3.), was der Verwendung von **porcinen**-SD-Membranen zur Diagnose von humanen TSH-Rezeptor-Antikörpern den Vorrang geben würde.

Nachdem dargestellt werden konnte, daß humane TSH-Rezeptor-Antikörper im heterologen System wirksam sind, wurde eine Methode entwickelt, um das Molekulargewicht des TSH-Rezeptors zu ermitteln:

In dieser unter 3.1. beschriebenen Versuchsmethode I wurde nach Präinkubation von in Triton solubilisierten Schweine-SD-Membranen mit $^{125}\text{-J-TSH}$ der erwartete $^{125}\text{-J-TSH*TSH-Rezeptor-Komplex}$ auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographiert. Im Vergleich dazu wurde $^{125}\text{-J-TSH}$ alleine aufgetrennt, um anhand der Molekulargewichtsdifferenz den Hormonrezeptor klassifizieren zu können. Da sich der $^{125}\text{-J-TSH*TSH-Rezeptor-Komplex}$ in dieser Methode jedoch nicht auftrennen ließ, war eine Aussage über das Molekulargewicht des TSH-Rezeptors nicht möglich. Dagegen erlaubte es diese Methode in einem weiteren Inkubationsansatz autoradiographisch darzustellen, daß TDA-positives-IgG TSH kompetitiv von seinen Bindungsstellen am TSH-Rezeptor verdrängen kann. Ein gleichzeitig ausgetestetes TDA-negatives Kontroll-IgG war dazu - wie erwartet - nicht in der Lage.

Damit konnte durch Versuchsmethode 3.1. zwar visuell gezeigt werden, daß humane TDA-positive-Antikörper am TSH-Rezeptor angreifen; die Beantwortung der Frage, welches Molekulargewicht dem spezifisch durch TDA-positives-IgG gebundenen Membranantigen zuzuordnen ist, war in diesem Versuch allerdings nicht möglich. Daher wurde ein weiterer Versuchsansatz entwickelt.

Dieser zweite, unter 3.2. beschriebene Versuchsansatz, entsprach vom Aufbau her am ehesten der Vorstellung einer einfachen Screeningmethode zur Darstellung der Bindung von humanen Antikörpern an ihr Schilddrüsenmembranantigen.

In dieser Methode wurden präparierte und solubilisierete.. Schweineschilddrüsenmembranen elektrophoretisch in einem nicht denaturierenden Verfahren aufgetrennt. In der Literatur wurden bisher nur SDS-Elektrophoresen, also Elektrophoresen unter reduzierenden Bedingungen, für die Auftrennung von Schilddrüsenmembranen beschrieben (8, 31). Bei diesem Verfahren besteht allerdings die Gefahr der Denaturierung der Membranproteine, so daß der nicht denaturierenden Elektrophorese mit Triton-X-100 der Vorzug gegeben wurde. Die elektrophoretisch aufgetrennten Membranen wurden anschließend auf Zetabinde geblottet. Das Proteinblotting auf Zetabinde ermöglicht eine direkte Inkubation der nach Molekulargewicht getrennten Antigene mit dem Antikörper, so daß sich die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion als eine Bande oder Bandenmuster auf der Matrix darstellen müßte. Die Elektrophoresebedingungen der solubilisierten Schweinemembranen und deren Bindungseigenschaften waren bereits ausgetestet. Als zu untersuchender Parameter verblieb das Blotting der Membranproteine.

Das elektrophoretische Proteinblotting von Makromolekülen ist eine relativ neue Methode, die zum ersten Mal von **Arnheim** und **Southern** 1977 (in "Cell" 11, 363 - 370) beschrieben und in den Folgejahren weiter verbessert wurde. Die Blottingbedingungen, wie Stromstärke, Spannung, Puffer und Blottingdauer variieren in der Literatur sehr stark - abhängig von der Art und der Verarbeitung der zu untersuchenden Proteine (25).

Die Austestung des quantitativen Transfers und der optimalen Blottingdauer für solubilisierete SSM mit Hilfe 125-J-markierter Schweinemembranen (3.2.2.3.) zeigte, daß nach ca. 3 Stunden ein maximaler Transfer Jod-markierter Membranen vom PAA 4/20-Gel auf die Matrix eintritt, der für Zetabinde 46 % und für Nitrocellulose 32 % betrug. Beide Matrices waren - wie aus Abbildung 22 zu entnehmen - in gewissem Umfang probendurchlässig. Daraus geht hervor, daß durch das Proteinblotting zwangsläufig ein Verlust des Antigenmaterials um mehr als 50 % eintritt, was sicherlich zu einer Abnahme der spezifischen Bindung von TSH an die Membranen führt (vgl. 4.2.1., Tabelle 2: Einfluß der Proteinkonzentration solubilisierter SSM auf das Bindungsverhalten im TDA). Der Quertransfer der Proteine vom PAA-Gel auf die Matrix war weiterhin abhängig von der Dicke des verwendeten PAA-Gels (siehe Abbildung 24) und dem Molekulargewicht des Membranproteins. Niedermolekulare Proteine wurden schneller als hochmolekulare Proteine transferiert (siehe Abbildung 23), so daß nicht mit einem prozentual gleichmäßigen Transfer unterschiedlich schwerer Membranantigene gerechnet werden darf.

Ein weiterer Nachteil des Proteinblottings bestand in der hohen unspezifischen Bindung der mit bSA abgesättigten Matrix (wie in 4.5.3. beschrieben). Das Absättigen

nach Proteinblot hat den Zweck, die noch vorhandenen freien Proteinbindungsstellen der Matrix abzudecken, so daß bei Inkubation mit dem 1. Antikörper dieser weitgehend spezifisch an seine Antigenbande binden sollte.

In der Untersuchung der Bindungskinetik von 125-J-TSH an auf Zetabinde gebundene SSM (4.5.3.) dagegen stellte sich heraus, daß die unspezifische Bindung des TSH-Tracers an die abgesättigte Matrix ca. 31 % der Tracerausgangsaktivität betrug, während die Bindung von 125-J-TSH an die Schweinemembranen (= SSM: 5x) 48 % der Ausgangsaktivität entsprach (siehe Abbildung 25). Daraus resultiert eine spezifische Bindung der SSM von 17 %, was einem Verhältnis spezifischer zu unspezifischer Bindung auf der Matrix von ca. 1 : 2 gleichkommt.

Nach diesen Voruntersuchungen sollte in Versuchsmethode 3.2. mit Hilfe des Proteinblottings das Molekulargewicht des TSH-Rezeptors ermittelt werden: Dazu wurden solubiliisierte Schweineschilddrüsenmembranen elektrophoretisch aufgetrennt und auf Zetabinde geblottet. Die geblottete Matrix wurde dann mit 125-J-TSH inkubiert und abschließend die Verteilung der Aktivität über der Matrix mit Hilfe eines Gamma-Counters bestimmt (siehe 3.2.3.2.):

Es wurden dabei zwei Aktivitätspeaks im Bereich

a) 180000 - 220000 D und

b) kleiner 24000 D

gemessen (siehe 4.5.4., Abbildung 26).

Der Peak von 180000 - 220000 D entspricht am ehesten den in der Literatur beschriebenen - allerdings sehr diversen - Angaben zum Molekulargewicht des TSH-Rezeptors (8, 12, 31, 33, 49, 52, 58). Die Aktivitätserhöhung im Bereich kleiner 24000 D könnte man auf TSH-Rezeptorbruchstücke zurückführen, die bei der Membranpräparation entstehen.

Mit Hilfe des Proteinblottings wurde ebenso untersucht, inwieweit klassifizierte Immunglobuline spezifisch an bestimmte, nach Molekulargewicht differenzierte Schilddrüsenmembranbanden binden können:

Die Inkubation der geblotteten Matrix mit TDA⁺⁺⁺-IgG als ersten Antikörper und Miles-Ak als zweiten Antikörper erbrachte keine spezifischen Banden. Darzustellen waren allerdings fünf unspezifische Banden bei 670000, 440000, 120000, 60000 und kleiner 50000 Dalton, die dem Bandenmuster des TDA-negativen Kontroll-IgG's entsprachen (siehe 4.5.5., Abbildung 27).

Durch Verwendung eines empfindlicheren zweiten Antikörpers (ABC-Vectastain^R, Prinzip siehe: 3.2.3.5.2.) gelang es schließlich bei Inkubation mit TDA⁺⁺⁺-IgG eine spezifische Bande bei 200000 D darzustellen. Im Vergleich zum Kontroll-IgG ergaben sich auch hier unspezifische Banden bei 670000, 440000, 60000 und kleiner 50000 D (siehe 4.5.6.1., Abbildung 28). Die spezifische Antigenbande entspricht in etwa dem in 4.5.4. ermitteltem TSH-Rezeptorbereich mit einem Molekulargewicht von 180000- 220000 D.

Die Frage, inwieweit IgG mit wachstumsstimulierenden Effekt auf die Schilddrüse (TGI-positives IgG, das im TDA-Assay keine TSH-Rezeptor-Antikörper aufwies) spezifisch an aufgetrennte Schilddrüsenmembranproteine bindet, wurde ebenfalls durch Immunoblotting untersucht:

Nach Inkubation der geblotteten Matrix mit TGI-positivem Patienten-IgG waren im Vergleich zum Kontroll-IgG nur unspezifische Banden bei 670000, 440000, 60000 und kleiner 50000 D zu erkennen (siehe 4.5.6.2.). Eine spezifische Bindung des TGI-positiven IgG's an bestimmte Membranbanden zeigte sich nicht.

Problematisch bei dieser unter 3.2. beschriebenen Versuchsmethode II war eine starke Hintergrundreaktion der Matrix nach Färbung mit Chloronaphtol, die eine sichere Abgrenzung und Beurteilung des Antigenbandenmusters vom Hintergrund nicht immer möglich machte. Die eigentlichen Probleme bestehen aber wohl vielmehr in der geringen Menge an "realem" TSH-Rezeptor- bzw. Antigen-Material, sowie in einer zu geringen Affinität zwischen Membranan-tigenen und humanen Antikörpern, deren Bindungsvermögen durch die insgesamt lange Versuchsdauer von über 35 Stunden sicherlich noch weiter abnimmt.

Auch die unter 3.3. beschriebene Versuchsmethode III untersuchte das antigene Verteilungsmuster verschiedener Schilddrüsenmembranantikörper: In diesem Versuchsansatz wurden grob präparierte Schweineschilddrüsenmembranen mit 125-Jod markiert, solubilisiert und anschließend mit TDA-positivem IgG inkubiert. Der entstandene 125-J-Anti-gen*Antikörper-Komplex wurde durch IgG-Affinitätschroma-tographie über Protein-A-Sepharose extrahiert. Um die Aussagekraft zu erhöhen, wurde der spezifisch eluierte Komplex elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiogra-phiert:

Dabei zeigte sich im Vergleich zu einem Kontroll-IgG autoradiographisch eine spezifische Antigenbande des TDA-positiven IgG's bei 170000 bis 210000 D Molekularge-wicht, neben wiederum unspezifischen Banden bei 670000, 440000 und 60000 - 75000 D.

Diese Bande bei 170000 bis 210000 D war spezifisch durch TSH verdrängbar. Daraus läßt sich ableiten, daß diese Antigenbande dem TSH-Rezeptor gleichzusetzen ist.

Neben der Untersuchung, inwieweit klassifizierte Schild-drüsenantikörper spezifisch an nach Molekulargewicht getrennte Schilddrüsenmembranbanden binden, war ein

weiteres Ziel der Arbeit zu untersuchen, ob die "thyroid-growth-stimulating immunoglobulins" (TGI) wirklich Antikörper gegen den TSH-Rezeptor darstellen:

Dazu wurde in Versuch 2.6. das Serum eines ausgewählten Patientengutes von sechs Patienten mit schnell wachsenden Strumen und damit dem Verdacht auf TGI-Antikörper in den folgenden Assays untersucht:

- a) im TDA-Assay zum Nachweis von TSH-Rezeptor-Antikörpern.
Dieser Assay mißt, ob das Patientenserum Antikörper enthält, die in der Lage sind, TSH von seinem präparierten Membranrezeptor zu verdrängen (Methode 2.2.)
- b) im TSI-Assay zum Nachweis von TSI oder TBII.
Dieser Assay mißt, ob nach Stimulation mit Patienten-IgG cycl. Adenosinmonophosphat aus Schilddrüsenfollikelzellen freigesetzt wird (Methode 2.4.)
- c) im TGI-Assay zum Nachweis von TGI.
Dieser Assay mißt das Wachstum vitaler Schilddrüsenfollikelzellen nach IgG-Stimulation durch Messung des Einbaus von ^3H -Thymin in die DNA der Schilddrüsenzelle (Methode 2.3.).

Von diesen sechs Patienten fielen zwei Patienten unter die Gruppe A, d.h. Patienten mit nicht immunogen bedingter Schilddrüsenerkrankung und vier Patienten unter die Gruppe B, d.h. Patienten mit immunogener Schilddrüsenerkrankung, sprich Morbus Basedow.

In dieser Untersuchung (siehe 4.3., Tabelle 7) zeigte sich, daß vier von sechs Patienten wachstumsstimulierende Antikörper besaßen. Zwei dieser Patienten fielen unter die Gruppe nicht immunogen bedingte Schilddrüsenerkrankung, die anderen beiden unter die Gruppe Morbus Basedow. Bei keinem dieser vier Patienten aber, die thyroid-growth-stimulating immunoglobulins besaßen, waren im TDA-Assay TSH-Rezeptor Antikörper nachzuweisen. Damit wurde das

theoretische Modell thyroid-growth-stimulating immunoglobulins gleich TSH-Rezeptor-Antikörper nicht bestätigt. Der fünfte Patient zugehörig der Gruppe B besaß TSH-Rezeptor-Antikörper, die im TSI-Assay der Gruppe der schilddrüsenstimulierenden Antikörper (TSI) zugerechnet werden konnten. Wachstumsstimulierende Antikörper (TGI) waren nicht nachweisbar. Dieser Patient bestätigt damit, daß Immunglobuline vom Typ TSI gegen den TSH-Rezeptor gerichtet sind. Der sechste Patient aus der Gruppe B stammend, zeigte in allen drei ausgeführten Assay's negative Ergebnisse.

Daraus muß man ableiten:

- thyroid-growth-stimulating immunoglobulins (TGI) greifen nicht am TSH-Rezeptor an.
- TGI tritt nicht nur bei immunogenen, sondern auch bei nicht immunogen bedingten Schilddrüsenerkrankungen, sprich der Jodmangelstruma, auf.

Nach der Feststellung, daß "TGI" wahrscheinlich gar nicht an den TSH-Rezeptor angreifen (siehe Versuchsergebnisse 4.3. und 4.5.6.2.), sollte mit Versuchsmethode IV (3.4.) das Bindungsverhalten von TGI-positivem IgG an radioaktiv-markierte Schilddrüsenmembranen untersucht werden mit der Fragestellung, ob "TGI" möglicherweise an den EGF-Rezeptor binden.

Dieser Versuch, der vom Aufbau her weitgehend der Versuchsmethode 3.3. entsprach, scheiterte allerdings daran, daß die nach IgG-Affinitäts-Chromatographie gewonnene Aktivität a) weitgehend unspezifisch war und b) so gering war, daß sie für eine Autoradiographie nach elektrophoretischer Auftrennung nicht ausreichte. Somit ließ dieser Versuch keine Aussagen über mögliche Schilddrüsenmembranantigene der thyroid-growth-stimulating immunoglobulins zu.

Zusammenfassend lassen sich als Ergebnisse festhalten:

- 1) Die Untersuchungen, inwieweit TSI spezifisch an nach Molekulargewicht differenzierte Schilddrüsenmembranen binden können, zeigte in zwei verschiedenen Versuchsansätzen, daß sich für diese Antikörpergruppe nur ein spezifisches Antigen darstellen ließ. Dieses spezifische Membranantigen entsprach vom Molekulargewicht her dem in dieser Arbeit ermitteltem TSH-Rezeptor mit einem Molekulargewicht von 180000 bis 220000 D.
- 2) Die Untersuchungen dieser Arbeit geben deutliche Hinweise dafür, daß die thyroid-growth-stimulating immunoglobulins keine TSH-Rezeptor-Antikörper sind. Die Frage, was sich hinter dem Begriff der "TGI" wirklich verbirgt, bleibt weiterhin offen.
Darüber hinaus muß allerdings diskutiert werden, ob diese postulierten "TGI" wirklich wachstumsstimulierende Immunglobuline darstellen oder ob nicht vielmehr Verunreinigungen der präparierten Immunglobuline mit wachstumsstimulierenden Substanzen für diesen Effekt verantwortlich sind. Für diese These sprechen neuere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe (23):

Wir untersuchten, ob "TGI" möglicherweise Antikörper sind, die an den EGF- oder den IGF I-Rezeptor der Schilddrüsenzellmembran binden. Diese Vermutung legte sich uns nahe, da wir bereits früher zeigen konnten, daß EGF und Insulin über Interaktion ihres jeweiligen Schilddrüsenmembranrezeptors, nämlich des EGF- bzw. des IGF I-Rezeptors, wachstumsstimulierend auf die Schilddrüse wirken (20). Für die Untersuchung wurde das IgG von Patienten mit rezidivierenden Strumen und damit Verdacht auf "TGI" durch Ammoniumsulfatfällung und Anionenaustausch-Chromatographie präpariert. Die wachstumsstimulierende Aktivität

des IgG's wurde dann durch Messung des Einbaus von ^3H -Thymin in die DNA isolierter Schilddrüsenfollikelzellen bestimmt. Um zu untersuchen, ob "TGI" an den EGF- oder den IGF I-Rezeptor bindet, wurden zwei verschiedene Versuchsmethoden durchgeführt: (1) Zuerst untersuchten wir, ob eine EGF- oder IGF I-Rezeptor-Verdrängungsaktivität des "TGI" in einer groben Schilddrüsenmembranpräparation nachweisbar ist - in Analogie zu dem TSH-Verdrängungs-Assay (TDA). Dazu verwendeten wir neben grob präparierten Schweineschilddrüsenmembranen TGI-positives Patienten-IgG, sowie 125-J-markiertes EGF bzw. 125-J-markiertes Insulin. (2) Als zweites wurden intakte Schilddrüsenzellen mit 125-Jod unter Verwendung von Lactoperoxidase radioaktiv markiert, dann in 1 % Triton solubilisiert und abschließend mit "TGI" inkubiert und zwar einmal unter Zugabe von EGF und zum anderen unter Zugabe von IGF I in ansteigenden Konzentrationen (aufwärts bis zu 10 ng/ml). Die Abtrennung von IgG gebundenen und freien Rezeptoren erfolgte durch IgG-Affinitätschromatographie über Protein-A-Sepharose.

Sechs von 22 ausgewählten Patienten mit rezidivierenden Strumen hatten eine signifikante TGI-Aktivität mit einer 6- bis 10-fachen ^3H -Thymin-Einbaurate über den basalen Wachstumswert. Bei keinem dieser 6 Patienten jedoch konnte eine EGF- oder Insulin-Verdrängungsaktivität nachgewiesen werden. Auch konnte nicht gezeigt werden, daß "TGI" an solubilisierete Schilddrüsenmembranen bindet, da keine Aktivitätsdifferenz zwischen den IgG-gebundenen und den freien Schilddrüsenmembranrezeptoren nach IgG-Affinitätschromatographie bestand.

Daraus schließen wir, daß "TGI" weder ein TSH-Rezeptor-Antikörper, noch ein EGF- oder IGF I-Rezeptor-Antikörper ist. Da weiterhin keiner dieser 6 Patienten mit "TGI" Anzeichen einer Autoimmunerkrankung aufwies, postulieren

wir, daß der wachstumsstimulierende Effekt des "TGI" möglicherweise durch Verunreinigungen der präparierten IgG-Fraktionen mit einem Wachstumsfaktor, z.B. dem epidermal-growth-factor (EGF), bedingt ist.

Insgesamt ist die Erforschung der Antigenreaktionsorte humaner Schilddrüsenantikörper bei Patienten mit Morbus Basedow ein klinisch interessantes Thema: So wird gehäuft bei Patienten mit immunogenen Schilddrüsenerkrankungen (vom Typ des M.Basedow) das Auftreten einer endokrinen Ophthalmopathie, sowie einer chronisch-atrophischen Gastritis mit perniziöser Anämie beschrieben: **Vorlaender** (56, 57) findet bei 30 % der Patienten mit immunogenen Schilddrüsenerkrankungen antigastritische Antikörper. Ebenso ist ein gehäuftes Auftreten der "Autoimmunthyreoiditis" mit Kollagenkrankheiten und Vitiligo bekannt (29). Es stellt sich daher die Frage, ob Kreuzreaktionen der Schilddrüsenantikörper mit Bestandteilen der Magenschleimhaut, der Cutis, sowie Strukturen des retrobulbären Bindegewebes und der Augenmuskeln existieren.

Diese Dissertationsarbeit sollte vom Methodischen her einen kleinen Schritt auf diesem Wege vermitteln. Eingehendere Untersuchungen auf diesem Gebiet bleiben weiterer Forschungsarbeit vorbehalten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der Diagnostik von immunogenen Schilddrüsenerkrankungen, wie z.B. dem M. Basedow, haben in den letzten Jahren neben den klassischen Schilddrüsenantikörpern (den mikrosomalen und Thyreoglobulinantikörpern) die TSH-Rezeptor-Antikörper ein zunehmendes wissenschaftliches und klinisches Interesse gewonnen. Diese TSH-Rezeptor-Antikörper werden pathophysiologisch in drei Subgruppen unterteilt: a) in schilddrüsenstimulierende Antikörper (TSI) mit Aktivierung des second messengers cAMP, b) in Antikörper, die die Bindung von TSH an den Rezeptor inhibieren (TBII) und c) Antikörper mit wachstumsstimulierendem Effekt auf die Schilddrüse (TGI), deren Wirkung bisher aber nicht näher erforscht ist.

Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Frage, ob die wachstumsstimulierenden Antikörper (thyroid-growth-stimu-lating immunoglobulins) wirklich TSH-Rezeptor-Antikörper darstellen und damit eine Klärung der Frage, inwieweit das immunogen bedingte Wachstum der Schilddrüse über den TSH-Rezeptor vermittelt wird. Ein weiteres Ziel war zu untersuchen, ob bei unterschiedlichen Verlaufsformen von immunogenen Schilddrüsenerkrankungen auch verschiedene Antikörperprofile gegen unterschiedliche Oberflächenantigene der Schilddrüsenzellmembran zu erkennen sind.

Zur Untersuchung, ob die TGI-Antikörper wirklich TSH-Rezeptor Antikörper sind, (was bisher noch nicht gezeigt werden konnte), wurde das Serum eines ausgewählten Patientengutes von 6 Patienten mit schnell wachsenden Strumen in den folgenden Assays untersucht: a) im TGI-Assay. In diesem Assay wird das Wachstum vitaler Schilddrüsenfollikelzellen nach IgG-Stimulation durch Messung des Einbaus von ^3H -Thymidin in die DNA der Schilddrüsenzelle gemessen und damit TGI-Antikörper nachgewiesen. b) Im Thyrotropin-Displacing-Activity Assay (TDA). Dieser Assay mißt, ob im Patientenserum Antikörper enthalten sind, die TSH von

seinem Rezeptor verdrängen können. c) Im TSI-Assay. Dieser Assay mißt, ob nach Stimulation mit Patienten-IgG cAMP aus Schilddrüsenfollikelzellen freigesetzt wird und weist damit schilddrüsenstimulierende (TSI) oder TSH-inhibierende Immunglobuline (TBII) nach.

In dieser Untersuchung zeigte sich, daß 4 von 6 Patienten wachstumsstimulierende Antikörper (TGI) besaßen. Bei keinem dieser 4 Patienten aber waren TSH-Rezeptor-Antikörper im TDA-Assay nachzuweisen, so daß das theoretische Modell: TGI-Antikörper gleich TSH-Rezeptor-Antikörper nicht bestätigt werden konnte. Der 5. Patient mit nachgewiesenen TSH-Rezeptor-Antikörpern besaß schilddrüsenstimulierende Antikörper (TSI), aber keine wachstumsstimulierenden Antikörper (TGI). Der 6. Patient zeigte als Kontrolle in allen drei durchgeführten Assays negative Ergebnisse.

Zur Untersuchung der Frage, inwieweit diese klassifizierten Immunglobuline (TSI und TGI) spezifisch an bestimmte - nach Molekulargewicht differenzierte - Schilddrüsenmembranbanden binden können, war es nötig, ein Verfahren zur Darstellung von Oberflächenantigenen der Schilddrüsenzellmembran, u.a. des TSH-Rezeptors, zu entwickeln: Dazu wurde eine Schilddrüsenmembranpräparation aus Schweineschilddrüsen durchgeführt mit anschließender Membransolubilisierung unter Austestung verschiedener Detergentien (Triton, SDS, Zwittergent). Es folgte eine hochauflösende elektrophoretische Auftrennung der präparierten und solubilisierten Schweineschilddrüsenmembranen auf Polyacrylamid-Dichtegradientengelen nach Molekulargewicht. Dabei zeigten die in Triton solubilisierten Schweineschilddrüsenmembranen die sauberste Proteinauftrennung mit den meisten Proteinbanden. An die elektrophoretische Proteinauftrennung schloß sich eine Querelektrophorese der Membranproteine auf ein Nylonsheet an (Immunoblotting). Auf diesem Nylonsheet (Zetabinde) werden die nach Molekulargewicht getrennten Membranproteine adsorptiv gebunden und können hier mittels spezifischer Antikörper nachge-

wiesen werden. Der immunologische Nachweis spezifischer Schilddrüsenmembran-Antigene erfolgte durch Inkubation der geblotteten Matrix mit präpariertem, humanem Patienten-IgG als 1. Antikörper und mit Anti-Human-IgG als 2. Antikörper. Dieser 2. Antikörper besaß ein Verstärkersystem und war über eine Peroxidasereaktion spezifisch anfärbbar.

Dabei ergab die Inkubation der geblotteten Matrix mit Human-IgG, das im TDA-Assay eindeutig TSH-Rezeptor-Antikörper aufwies, im Vergleich zu einem Kontroll-IgG, das keine TSH-Rezeptor-Antikörper besaß, eine spezifisch anfärbbare Antigenbande im Bereich von 200000 Dalton Molekulargewicht.

Mit Hilfe des Proteinblottings konnte weiterhin der TSH-Rezeptor - als ein Membranantigen - vom Molekulargewicht her bestimmt werden: Die geblottete Matrix wurde mit 125-J-TSH inkubiert und anschließend die radioaktive Verteilung auf der Matrix gemessen. Dabei zeigte das 125-J-TSH die stärkste Bindung an Schilddrüsenmembranbanden im Molekulargewichtsbereich von 180000 bis 220000 Dalton, so daß hier der TSH-Rezeptor zu vermuten ist. Dieser Aktivitätspeak des 125-J-TSH entspricht damit in etwa der spezifisch anfärbbaren Antigenbande bei Inkubation der Matrix mit TDA-positivem IgG.

Die Frage, inwieweit IgG mit wachstumsstimulierendem Effekt auf die Schilddrüse (TGI-positives IgG, das im TDA-Assay keine TSH-Rezeptor-Antikörper aufwies) an aufgetrennte Schilddrüsenmembranproteine spezifisch bindet, wurde ebenfalls durch Immunoblotting untersucht: Die Inkubation der geblotteten Matrix mit TGI-positivem Patienten-IgG zeigte im Vergleich zum Kontroll-IgG nur unspezifische Banden. Eine spezifische Bindung des TGI-positiven IgG's an bestimmte Membranbanden war nicht zu erkennen. Dies Ergebnis ist als weiterer Hinweis dafür zu werten, daß TGI möglicherweise keine TSH-Rezeptor-Antikörper darstellen.

Auch eine zweite Versuchsmethode, in der das antigene Verteilungsmuster verschiedener Schilddrüsenmembranantikörper untersucht wurde, zeigte, daß TDA-positives IgG spezifisch an eine Schilddrüsenmembranbande mit einem Molekulargewicht im Bereich von 170000 bis 210000 Dalton bindet: Für diesen Versuch wurden präparierte Schilddrüsenmembranen mit 125-Jod markiert, solubilisiert und anschließend mit TDA-positivem IgG inkubiert. Der sich bildende 125-J-Antigen-Antikörper Komplex wurde durch IgG-Affinitätschromatographie über Protein-A abgetrennt. Um eine bessere Aussagekraft zu erhalten, wurde dieser spezifisch eluierte Komplex elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographiert. Dabei zeigte sich im Vergleich zum Kontroll-IgG eine spezifische Antigenbande bei 170000 bis 210000 Dalton, die durch TSH verdrängbar war. Daraus läßt sich ableiten, daß diese spezifische Antigenbande des TDA-positiven IgG's dem TSH-Rezeptor entspricht. Ein weitgehend ähnlicher Versuchsansatz, in dem das Bindungsverhalten von TGI-positivem IgG an radioaktiv markierte Schilddrüsenmembranen untersucht werden sollte, scheiterte daran, daß die nach IgG-Affinitätschromatographie gewonnene Antigenaktivität so gering war, daß sie für eine Autoradiographie nicht ausreichte.

Die bisherigen Untersuchungen dieser Arbeit geben Hinweise dafür, daß die TGI-Antikörper keine TSH-Rezeptor-Antikörper sind. Darüber hinaus muß diskutiert werden, ob die postulierten "TGI-Antikörper" wirklich wachstumsstimulierende Immunglobuline darstellen, oder ob nicht vielleicht Verunreinigungen der präparierten Immunglobuline mit wachstumsstimulierenden Substanzen für diesen Effekt verantwortlich sind.

Die Untersuchungen, inwieweit TSI-Immunglobuline spezifisch an nach Molekulargewicht differenzierte Schilddrüsenmembranbanden binden können, zeigte in zwei verschiedenen Versuchsansätzen, daß für diese Antikörper nur ein spezifisches Antigen existiert, das vom Molekulargewicht her dem - in dieser Arbeit ermittelten - TSH-Rezeptor entspricht.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Bayer, E., E. Skutelsky, M. Wilchek:
The avidin-biotin complex in affinity cytochemistry.
Methods Enzymol., 62, 308 (1979)
2. Bech, K., H. Bliddal, K. Sierbaek-Nielsen, T. Fries:
Production of non-stimulatory immunoglobulins
that inhibit TSH binding in Graves' disease
after radioiodine administration.
Clin. Endocrinol., 17, 395 (1982)
3. Bech, K., S. Nistrup Madsen:
Thyroid adenylate cyclase stimulating immunoglo-
bulins in thyroid diseases.
Clin. Endocrinol., 11, 47 (1979)
4. Bernutz, C., R. Gärtner, N. Kewenig, K. Horn:
A sandwich enzym immunoassay (EIA) for the
determination of thyroglobuline antibodies
(TgAb) in human serum.
Acta Endocrinol. (KbH), 246, 80 (1982)
5. Bidey, St. P., N.J. Marshall, R.P. Ekins:
Adenylate cyclase activity and the accumulation
and release of cyclic adenosine 3', 5'-monophos-
phate in normal human thyroid tissue slice pre-
parations: Responses to thyrotropin and thyroid-
stimulating antibodies.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 53, 246 (1981)
6. Bidey, St. P., N.J. Marshall, R.P. Ekins:
Characterisation of cyclic AMP response to
thyrotropin in monolayer cultures of normal
human thyroid.
Acta Endocrinol. (KbH), 98, 370 (1981)
7. Bio-Rad-Laboratories:
Southern, Western and Electroblothing.
Bulletin, 1080 (June 1981)
8. Buckland, P.R., C. R. Rickards, R.D. Howells, E.D.
Jones, B.R. Smith:
Photo-affinity labelling of the thyrotropin re-
ceptor.
Biomedical Press, 145-2, 245 (1982)

9. Burnett, W. Neal:
"Western-Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from SDS-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.
Analytical Biochem., 112, 195 (1981)
10. Chrambach, A., A.C. Newby, E. Baileyes:
The choice of detergents for molecular characterisation and purification of native intrinsic membrane proteins.
Techniques in Lipid and Membrane Biochemistry, B 409, 1 ff. (1982)
11. Chvatchko, Y., H. Gazzano, E. v. Obberghen, M. Fehlmann:
Subunit arrangement of insulin receptors in hepatoma cells.
Molecular and Cellular Endocrin., 36, 59 (1984)
12. Dawes, P.J.D., U.B. Petersen, B.R. Smith, R. Hall:
Solubilisation and partial characterisation of human and porcine thyrotropin receptors.
J. Endocrinol., 78, 89 (1978)
13. Doniach, D., L. Chiovato, T. Hanafusa, G.F. Bottazzo:
The implication of "Thyroid-Growth-Immunoglobulins" (TGI) for the understanding of sporadic nontoxic nodular goitre.
Springer Sem. Immunopath., 5, 433 (1982)
14. Drexhage, H. A., G. F. Bottazzo, D. Doniach, L. Bitensky:
Evidence for thyroid-growth-stimulating immunoglobulins in some goitrous thyroid diseases.
Lancet, II, 287 (1980)
15. Endo, K., K. Kasagi, J. Konishi, K. Ikekubo, T. Okuno, Y. Takeda, T. Mori, K. Torizuka:
Detection and properties of TSH-binding inhibitor immunoglobulins in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 46, 734 (1978)
16. Evans, Howard:
Preparation and characterisation of mammalian plasma membranes. Laboratory techniques in biochem. and molecular biology.
Elsevier Science Publishers B.V. (1984)
17. Frisch, O.R.:
The Nuclear Handbook
G. Newnes Ltd., London, Section 18 - 41 (1958)

18. Gaag van der, R.D., H.A. Drexhage, N.M. Wiersinga, R.S. Brown, R. Docter, G.F. Bottazzo, D. Doniach: Further studies on thyroid-growth-stimulating immunoglobulins in euthyroid nonendemic goiter. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 60-5, 972 (1985)
19. Gärtner, R., W. Greil, A. Witte, B. Mayinger, K. Horn, R.C. Pickardt: Evidence that thyroid-growth-stimulating immunoglobulins (TGI) are not directed against the TSH-receptor. Proceedings of the 9th International Thyroid Congress, Sao-Paulo, Brazil, Plenum Press, New York (1985)
20. Gärtner, R., W. Greil, R. Demharter, K. Horn: Insulin and epidermal growth factor are growth factors for isolated porcine thyroid follicles. *Acta Endocrinol.*, 29. Symposium Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie, Suppl. 267, Vol. 108. 74 (1985)
21. Gärtner, R., W. Greil, P. Demharter, K. Horn: Involvement of cyclic AMP, iodide and metabolites of arachidonic acid in the regulation of isolated porcine thyroid follicles. *Molecular and Cellular Endocrinol.*, 42, 145 (1985)
22. Gärtner, R., W. Greil, D. Stübner, W. Permanetter, K. Horn, C.R. Pickardt: Preparation of porcine thyroid follicles with preserved polarity: functional and morphological properties in comparison to inside-out follicles. *Molecular and Cellular Endocrinol.*, 40, 9 (1985)
23. Gärtner, R., W. Greil, B. Mayinger, A. Witte, C.R. Pickardt: What ist thyroid growth promoting activity ("TGI")? Proceedings of the International Symposium Thyroid and Autoimmunity, Amsterdam (1986)
24. Gershoni, J.M., G.E. Palade: Electrophoretic transfer of proteins from SDS-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter. *Analytical Biochem.*, 124, 396 (1982)

25. Gershoni, J.M., G.E. Palade:
Protein Blotting: Principles and Application.
Analytical Biochem., 131, 1 (1983)
26. Görg, A., W. Postel, P. Righetti, K. Ek:
One and two dimensional electrophoresis performed horizontally in ultrathin SDS pore-gradient gels.
LKB-information-booklet, Application Note 320 (1981)
27. Gossage, A.A.R., P.G.H. Byfield, S. Copping, R.L. Himsworth:
A comparative study of the binding of Graves Immunoglobulins by the patients' own and other thyroid membranes.
Clin. Endocrinol., 14, 301 (1981)
28. Greil, W., R. Gärtner, R. Demharter, K. Horn:
Thyrotropin is not a growth factor for porcine thyroid cells in vitro.
Acta Endocrinol., 29. Symposium Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie, Suppl. 267, Vol. 108, 73 (1985)
29. Harrison, T.R.:
Principles of Internal Medicine:
Mc Graw-Hill Book Company (1983), S. 624 ff.
30. Hawkins, B.R., P.S. Cheah, R.I. Dawkins, S. Whittingham, H.G. Burger, Y. Patel, I.R. Mackay, T.A. Welborn:
Diagnostic significance of thyroid microsomal antibodies in a randomly selected population.
Lancet, 2, 1057 (1980)
31. Heyma, P., L.C. Harrison:
Precipitation of the thyrotropin receptor and identification of thyroid autoantigens using Graves' disease immunoglobulins.
J. Clin. Invest., 74, 1090 (1984)
32. Hjelm, H., S. Sjö Dahl, J. Sjöquist:
Immunologically active and structurally similar fragments of protein A from Staphylococcus aureus.
Eur. J. Biochem., 57, 395 (1975)

33. Koizumi, Y., M. Zakarija, J.M. Mc Kenzie:
Solubilisation, purification and partial characterisation of thyrotropin receptor from bovine and human thyroid glands.
Endocrinol., 110-4, 1381 (1982)
34. Laemmli, U.K.:
Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄.
Nature, 227, 680 (1970)
35. Marschner, J., H. Dobry, F. Erhardt, T. Landersdorfer, P.C. Scriba:
Berechnung radioimmunologischer Meßwerte mittels Spline-Funktionen.
Ärztl. Labor, 20, 184 (1974)
36. Moritz, J.:
A study on the biosynthesis of protein A in Staphylococcus aureus.
Eur. J. Biochem., 48, 131 (1974)
37. Orgiazzi, J., D.E. Williams, J.J. Copra, D.H. Solomon:
Human thyroid adenyl-cyclase-stimulating activity in immunoglobulins G of patients with Graves' disease.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 42, 341 (1976)
38. Rapoport, B., F.S. Greenspan, S. Filetti, N. Pepitone:
Clinical experience with a human thyroid cell bioassay for thyroid-stimulating immunoglobulins.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 58, 332 (1984)
39. Rapoport, B., S. Filetti, , N. Takai, P. Seto, G. Halverson:
Studies on the cyclic AMP response to thyroid-stimulating immunoglobulins (TSI) and thyrotropin (TSH) in human thyroid cell monolayers.
Metabolism, 31, 1159 (1982)
40. Schleicher & Schuell Inc.
Protein Blotting
Information-booklet by Gooderham (1981)
41. Shewring, G.A., B.R. Smith:
An improved radioreceptor assay for TSH receptor antibodies.
Clin. Endocrinol., 17, 409 (1982)

42. Sjöquist, J., B. Meloun, H. Hjelm:
Protein A isolated from *Staphylococcus aureus*
after digestion with lyostaphin.
Eur. J. Biochem., 29, 572 (1972)
43. Smith, B.R., K. Southgate, F. Creagh, M. Teece, C.
Kingswood:
A receptor-assay for the measurement of TSH-re-
ceptor antibodies in unextracted serum.
Clin. Endocrinol., 20, 539 (1984)
44. Smith, B.R.:
Characterisation of long-acting thyroid stimula-
tor gamma-G-binding protein.
Biochem. Biophys. Acta, 229, 649 (1971)
45. Smith, B.R., G.A. Pyle, V.B. Peterson, R. Hall:
Interaction of thyroid-stimulating antibodies
with the human thyrotropin receptor.
J. Endocrinol., 75, 401 (1977)
46. Smith, B.R., R. Hall:
Measurement of thyrotropin receptor antibodies.
Methods in Encymology, 74 405 (1981)
47. Strakosch, C.R., D. Joyner, J.R. Wall:
Thyroid-stimulating antibodies in patients with
autoimmune disorders.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 47, 361 (1978)
48. Su-Ming, H., L. Raine, H. Fanger:
Use of Avidin-Biotin Peroxidase Complex (ABC)
in immunoperoxidase techniques.
J. of Histochemistry and Cytochem, 29-1, 577
(1981)
49. Tate, R.L., J.M. Holmes, L.D. Kohn, R.J. Winand:
Characteristics of a solubilized thyrotropin
receptor from bovine thyroid plasma membranes.
J. Biol. Chem., 250, 6527 (1975)
50. Teng, C.S., B.R. Smith, B. Clayton, R. Hall:
Thyroid-stimulating immunoglobulins in ophthalmic
Graves' disease.
Clin. Endocrinol., 6, 207 (1977)
51. Tjerk, W.A., H. de Bruin, D. v.d. Heide, M.C. Krol:
Anti-TSH receptor antibodies in Graves' disease
modulate the kinetic behaviour of autologous
thyroid TSH-receptors. Evidence of the IgG-indu-
ced cross-linkage of autologous TSH-receptors.
Acta Endocrinol. (KbH), 105, 330 (1984)

52. Tjerk, W.A., H. de Bruin, D. v.d. Heide:
Solubilized human thyrotropin receptors behave
as one class of high-affinity binding sites.
Molecular and Cellular Endocrinol., 37, 337
(1984)
53. Towbin, H., T. Staehlin, J. Gordon:
Electrophoretic transfer of proteins from poly-
acrylamide gels to nitrocellulose sheets.
Biochemistry, 76, 4390 (1979)
54. Valente, W.A., P. Vitte, C.M. Rotella, M. Vaugham,
S.M. Aloj:
Antibodies that promote thyroid growth:
A distinct population of thyroid-stimulating
antibodies.
The New Journal of Medicine, 309, 1028 (1983)
55. Verwey, E.F.:
A type-specific protein derived from the staphy-
lococcus.
J. Experim. Med., 71, 635 (1940)
56. Vorlaender, K.O.:
Diagnostik unter Verwendung immunologischer
Methoden.
Thieme-Verlag (1980), S. 144 u. S. 166
57. Vorlaender, K.O.:
Diagnostik unter Verwendung immunologischer
Methoden.
Thieme-Verlag (1980), S. 167
58. Yasuhiro, I., J. Konishi, K. Kasagi, K. Ikekubo, K.
Kuma, K. Torizuka:
Characterisation of triton-solubilized TSH-re-
ceptors from human thyroid plasma membranes.
Acta Endocrinol., 98, 50 (1981)

L E B E N S L A U F

Brigitte Mayinger, geboren am 6. Januar 1962 in München als Tochter des Dr. - Ing. Franz Mayinger und seiner Ehefrau Franziska, geb. Lindermeir.

Schulbildung

1968 - 1970	: Volksschule in Nürnberg
1970 - 1972	: Volksschule in Laatzen bei Hannover
1972 - 1980	: humanistisch - altsprachliches Kaiser - Wilhelms - Gymnasium in Hannover
Dezember 1980	: Abitur; Gr. Latinum, Gr. Graecum

Studium

SS 1981 - SS 1983	: Studium der Humanmedizin an der Albert - Ludwigs - Universität in Freiburg i.Br.
WS 83/84 - WS 85/86	: Studium der Humanmedizin an der Ludwig - Maximilians - Universität in München
SS 1986 - WS 86/87	: Praktisches Jahr im Zentralklinikum Augsburg (Lehrkrankenhaus der LMU) mit Wahlfach Pädiatrie.

Examina

März 1983	: Ärztliche Vorprüfung
März 1984	: 1. Medizinisches Staatsexamen
März 1986	: 2. Medizinisches Staatsexamen
Juli 1986	: Amerikanisches Staatsexamen (FMGEMS)
Mai 1987	: 3. Medizinisches Staatsexamen

Arzt Tätigkeiten

27. Mai 1987	: Approbation als Ärztin
Juni 1987	: Gastarzt am Beth Israel Hospital der Harvard - Medical - School in Boston, Medicine, Dep. of Endocrinology (Direktoren: Prof. Ingbar und Prof. Landsberg)
Juli 1987	: Gastarzt am Beth Israel Hospital der Harvard - Medical - School in Boston, Medicine, Dep. of Gastroenterology (Direktor: Prof. Goyal)
August 1987	: Assistenzärztin für Innere Medizin im Zentralklinikum Augsburg (Direktor: Prof. Renner)

Im Mai 1984 begann ich unter der Betreuung von Herrn Dr. R. Gärtner und Herrn Professor Dr. K. Horn in der Endokrinologischen Abteilung der Medizinischen Klinik Innenstadt der Ludwig - Maximilians - Universität in München (Leiter: Professor Dr. E. Buchborn) mit den Untersuchungen zur vorliegenden Dissertationsarbeit.

